



Integration der Biochemie in die Physik der Grenzfläche

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität Augsburg

von

Bernhard Fichtl

Augsburg, Dezember 2015

UNIA
Universität
Augsburg
University

EXP¹
Universität Augsburg
Lehrstuhl für
Experimentalphysik I

Erstgutachter: Prof. Dr. Matthias Schneider
Zweitgutachter: Prof. Dr. Henning Höppe

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 2016

Inhaltsverzeichnis

Kurzbeschreibung	vii
1. Einleitung	1
2. Biologische Membranen	5
2.1. Lipide	7
2.1.1. Der chemische Aufbau	7
2.1.2. Die physikalischen Phasenzustände	9
2.2. Proteine und Peptide	10
2.3. Thermodynamik von Grenzschichten	12
2.4. Elektrostatik von Grenzflächen	17
2.5. Untersuchung von Lipidmonolagen mittels der Filmwaagentchnik	19
2.5.1. Geschichte und Prinzip der Filmwaagentchnik	19
2.5.2. Phasenzustände von Lipidmonolagen	22
2.5.3. Oberflächenpotentialmessung von Lipidmonolagen	25
3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht	27
3.1. Einführung in die Enzymtheorie	27
3.2. Theoretisches Modell von Konrad Kaufmann	30
3.2.1. Zusammenhang zwischen Raten und Fluktuationen	32
3.2.2. Korrelation von Spezifität und Aktivität	34
3.2.3. Enzyme als Teil einer Grenzschicht	34
3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen	37
3.3.1. Vorstellung der Katalase	37
3.3.2. Voruntersuchungen zur Katalase	38
3.3.3. Zustandsabhängigkeit der Katalase	41
3.3.4. Vorstellung der Meerrettichperoxidase	44
3.3.5. Methodik der Aktivitätsmessung	44
3.3.6. Zustandsabhängigkeit der Meerrettichperoxidase	46
3.4. Diskussion der Ergebnisse auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene	52
3.4.1. Thermodynamische Diskussion der Experimente	52
3.4.2. Mikroskopischer Erklärungsversuch	52
3.5. Zusammenfassung	53

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten	57
4.1. Wellenphänomene in Lipidmonolagen	57
4.2. Theoretische Beschreibung von Schallwellen in Grenzschichten	59
4.3. Aufbau zur Erzeugung und zum Nachweis der Pulse	61
4.4. pH-Anregung von Grenzflächen	63
4.4.1. pH-abhängige Anregung von Pulsen	66
4.4.2. Einfluss der Anregungsstärke auf die Pulsform	68
4.5. Temperaturanregung von Grenzflächen	70
4.6. Zustandsabhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit	72
4.7. Kollidierende Pulse	73
4.8. Chemische Eigenschaften der Pulse	75
4.9. Elektrische Eigenschaften der Pulse	78
4.10. Zusammenfassung und Diskussion	82
5. Puls-Enzym-Wechselwirkung	87
5.1. Wechselwirkung zwischen Pulsen und der Acetylcholinesterase	88
5.1.1. Vorstellung der Acetylcholinesterase	88
5.1.2. Methodik der Puls-Enzym-Messung	89
5.1.3. Referenzmessungen	90
5.1.4. Experimentelle Untersuchung der Wechselwirkung	91
5.1.5. Diskussion	97
5.2. Wechselwirkung zwischen Pulsen und der Phospholipase A ₂	99
5.2.1. Vorstellung der Phospholipase A ₂	99
5.2.2. Referenzmessungen	99
5.2.3. Experimentelle Untersuchung der Wechselwirkung	100
5.2.4. Diskussion	102
5.3. Zusammenfassung	102
6. Zusammenfassung und Ausblick	105
6.1. Einfluss statischer Zustandsänderungen auf Enzyme	105
6.2. Dynamische Zustandsänderungen in Lipidmonolagen	106
6.3. Einfluss dynamischer Zustandsänderungen auf Enzyme	107
6.4. Schlussbemerkung	108
A. Anhang	111
A.1. Referenzmessungen zum Pyrogallol-Assay	111
A.2. Einbau der Meerrettichperoxidase in eine DPPG-Monolage	113
A.3. Zusammenhang zwischen der Aktivität und den Fluktuationen der Acetylcholinesterase	114

A.4. Referenzmessungen zur Pulsanregung	115
A.5. HCl- und CO ₂ -Anregung von Grenzflächen	116
A.6. Weitere Kollisionsmessungen	117
A.7. Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals I _V vom Lateraldruck und pH-Wert der Subphase	118
A.8. Oberflächenpotentialpulse	119
A.9. Aktivität der Acetylcholinesterase im isothermen Fall	120
A.10.Acetylcholinesterase-CO ₂ -Puls-Wechselwirkung	121
A.11.Acetylcholinesterase-Hexan-Puls-Wechselwirkung	122
B. Methodische Details	123
Literaturverzeichnis	127
Abkürzungsverzeichnis	143
Danksagung	145

Kurzbeschreibung

Diese Arbeit ist zum einen dadurch motiviert, dass physikalische Gesetze einen universellen Charakter besitzen und deshalb auch für die Vorgänge des Lebens gültig sein sollten. Zum anderen ist sie von der Idee inspiriert, dass biologische Grenzschichten (z. B. (Zell-)Membranen*), die das Grundgerüst allen Lebens bilden, weit mehr sind als semipermeable Barrieren: Sie stellen ein unabhängiges thermodynamisches System dar, das auf Störungen seiner Umgebung mit statischen und dynamischen Zustandsänderungen reagiert. Folglich können mit Hilfe des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik experimentell falsifizierbare Vorhersagen über das System und dessen Verhalten getroffen werden.

Indes ist bekannt, dass die Aktivität von Enzymen entscheidend von äußeren Parametern, wie beispielsweise pH, Temperatur, Druck, Ionenstärke etc. abhängt. Da ein Großteil der Enzyme in der Natur aber nicht frei vorliegt, sondern in Membranen eingebettet ist, stellt sich die Frage, welche Rolle die physikalischen Eigenschaften dieser Grenzflächen für die biochemischen Prozesse der Zelle und damit für das Leben selbst spielen.

Diese Frage wird in der vorliegenden Dissertation anhand von (Lipid-)Monolagen, welche ein einfaches Membranmodell bilden, untersucht. Die auf einer Filmwaage durchgeführten Experimente erlauben es, physikalische und chemische Parameter wie z. B. Temperatur, pH, Ionenkonzentration etc. über einen weiten Bereich hinweg zu modifizieren und somit den physikalischen Zustand der Lipidmonolage gezielt zu manipulieren. Die Experimente in dieser Arbeit werden dabei in statische und dynamische Zustandsänderungen unterteilt:

Im ersten Teil wird analysiert, wie sich quasi-statische Zustandsänderungen von Grenzschichten auf die Aktivität der Enzyme Katalase und Meerrettichperoxidase auswirken. Mittels einer Monolage wird demonstriert, dass die katalytische Rate der Enzyme vom Zustand des Systems abhängt. Dabei ist das entscheidende Maß die Suszeptibilität, d. h. unter dem Gesichtspunkt der Mechanik nicht wie häufig angenommen der Druck, sondern die Kompressibilität κ_T . Gleichzeitig ist die Kompressibilität an alle anderen Suszeptibilitäten des Systems, wie beispielsweise die Wärmekapazität c_p oder die elektrische Kapazität C_T , gekoppelt. Im Phasenübergang der Monolage wird sowohl die Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme als auch die Kompressibilität der Grenzschicht maximal. Thermodynamisch gesehen bedeutet dies, dass die katalytische Rate der Enzyme durch die Fluktuationen des Gesamtsystems reguliert

*In dieser Arbeit werden aufgrund des weiteren Gültigkeitsbereichs meist die Überbegriffe Grenzschicht und Grenzfläche für Membranen verwendet. So kann beispielsweise die Hydrathülle eines Proteins ebenfalls als Grenzschicht bezeichnet werden, nicht aber als Membran.

Kurzbeschreibung

wird. Diese Beobachtung ist invariant gegenüber Änderungen von Lipid, pH, Temperatur und Enzym und kann daher als allgemein angesehen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die dynamischen Eigenschaften von Lipidmonolagen und deren Einfluss auf Enzyme analysiert. Dabei wird zum ersten Mal gezeigt, dass mit einer lokalen pH-Erniedrigung propagierende akustische Pulse in Monoschichten erregt werden können. Die Pulse breiten sich mit einer Geschwindigkeit von circa 1 m/s aus und modulieren gleichzeitig alle Variablen der Grenzschicht. So sind die Pulse nicht rein mechanisch, sondern verändern simultan das Oberflächenpotential und den pH-Wert an der Grenzfläche. Weiterhin wird mittels einer lokalen Temperaturänderung illustriert, dass prinzipiell jede Variable der Grenzschicht zur Anregung von Pulsen verwendet werden kann.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wird ein neues Modell der Zellkommunikation vorgeschlagen, das auf der Erregung und Ausbreitung von akustischen Pulsen basiert. Anhand der Enzyme Acetylcholinesterase und Phospholipase A₂ wird nachgewiesen, dass die Pulse die Funktion von Proteinen (hier die Katalyse) in der Grenzschicht signifikant beeinflussen und somit für die Signaltransduktion in natürlichen Systemen in Frage kommen.

Zusammenfassend stellen diese experimentellen Ergebnisse einen entscheidenden Schritt bei der Integration der Biochemie in ein physikalisches Weltbild dar. Sie belegen, dass der physikalische Zustand von Grenzschichten die Aktivität von Enzymen statisch wie dynamisch steuern kann. Zellkommunikation wird damit zu einer Folge des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik, angewandt auf biologische Grenzschichten.

1. Einleitung

Vor 75 000 Jahren bevölkerten nur etwa 1000 bis 10 000 Menschen diese Erde. Vor 2000 Jahren waren es bereits 300 Millionen und heute unglaubliche 7,5 Milliarden [1]. Wie kam es zu der enormen Zunahme in dieser erdgeschichtlich gesehen extrem kurzen Zeitspanne? Anthropologen sehen den Hauptgrund dafür in der einzigartigen Kooperationsfähigkeit unserer Spezies. Kein anderes Lebewesen kann mit annähernd einer solchen Zahl von Gruppenmitgliedern so konstruktiv zusammenarbeiten wie wir es tun. Diese Fähigkeit wird uns erst durch die unvergleichliche Komplexität unseres Gehirns ermöglicht. Schätzungen zu Folge besteht es aus circa 10^{11} Nervenzellen, die über chemische Synapsen miteinander kommunizieren [2]. Jede Zelle verfügt dabei wiederum über Tausende von Verbindungen (Synapsen) zu ihren Nachbarzellen, was die Kommunikationsmöglichkeiten auf etwa 10^{15} erhöht. Würde man alle Nervenzellen eines Menschen hintereinander reihen, ergäbe sich eine Kette von den Alpen bis hin zur Nord- bzw. Ostsee (siehe Abbildung 1.1a).

Das Gehirn bildet aber nur einen kleinen Teil unseres Körpers und trägt somit auch nur einen geringen Beitrag zur Gesamtzahl der Zellen bei. Hochrechnungen gehen von bis zu 10^{14} Zellen pro Mensch aus [3]. Jede Zelle stellt dabei physikalisch gesehen eine Grenzfläche dar. Ihr Inneres ist durch Membranen in Kompartimente, wie beispielsweise Zellkern, Mitochondrien oder Endoplasmatisches Retikulum, untergliedert. Könnten wir die gesamte Zellmembran unseres Körpers ausbreiten, so kämen wir auf die unglaubliche Fläche von 100 km^2 , was in etwa der Größe Augsburgs entspricht (siehe Abbildung 1.1b) [3]. Plakativ ausgedrückt bedeutet dies, dass wir eine riesige Ansammlung von Grenzschichten sind. Das wirft die Fragen auf, wozu wir diese ungeheure Zahl an Oberflächen brauchen und welche Rolle die Physik dafür spielt. Bisher lautet die teleologische Antwort nach dem Nutzen dieser Grenzschichten: für die Trennung von Prozessen und Reaktionen. Es ist hinlänglich bekannt, dass (Zell-)Membranen semipermeabel sind und somit nur bestimmte Moleküle diese Grenzschicht passieren können. Folglich kann die Zelle gezielt steuern, welche Stoffe sie in welchem „Reaktionskompartiment“ benötigt und gleichzeitig ein konstantes chemisches Milieu aufrechterhalten.

In dieser Arbeit möchte ich zeigen, dass Membranen weit mehr sind als reine Barrieren. Der erste Teil der Arbeit widmet sich den statischen, regulativen Eigenschaften dieser Grenzschichten. Die Grundstruktur von Membranen wird durch eine Lipiddoppelschicht gebildet. Darin sind Proteine eingebettet, die sehr sensitiv auf den Zustand ihrer Umgebung reagieren. Es ist beispielsweise bekannt, dass je nach Phasenzustand der Grenzschicht sich die Aktivierungsenergie von membrangebundenen Enzymen verändern kann [4, 5]. Daher ist es

1. Einleitung

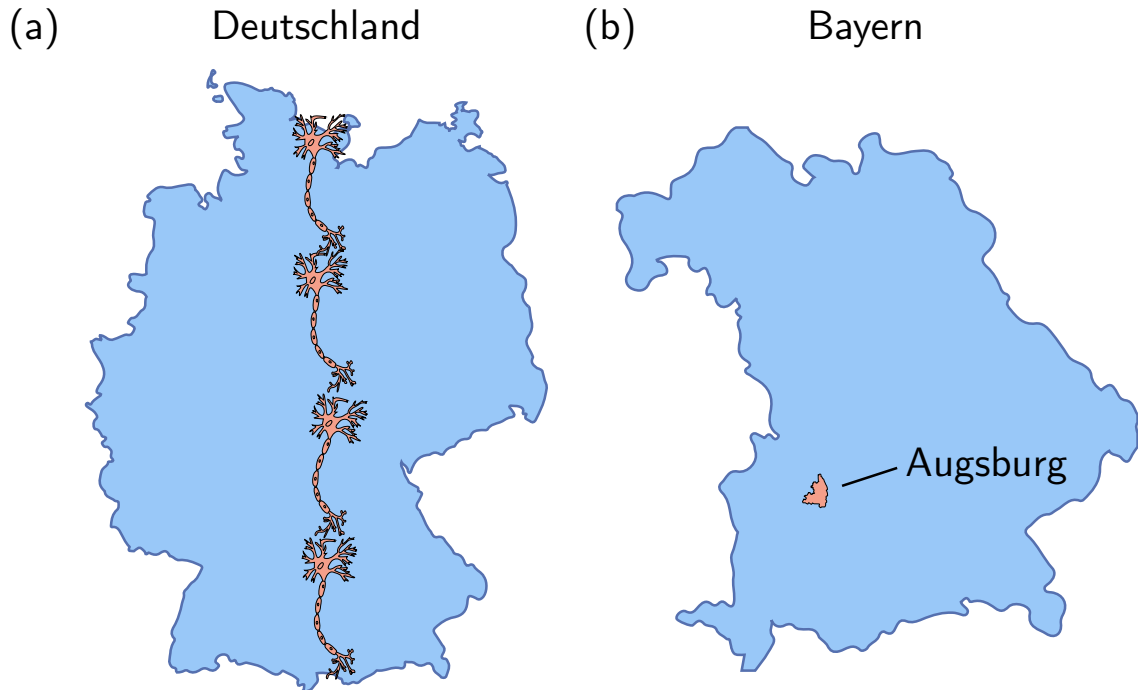


Abbildung 1.1.: Veranschaulichung der immensen Zahl an menschlichen Zellen: **(a)** Könnte man alle Nervenzellen eines Menschen hintereinander legen, so würde die Kette vom äußersten Süden Deutschlands bis hinauf zur Ost- bzw. Nordsee reichen. **(b)** Ließen sich die Membranen aller Zellen des menschlichen Körpers auffalten und nebeneinander positionieren, so würde dies eine Fläche von der Größenordnung Augsburgs ergeben.

von großem Interesse zu verstehen, wie und warum Grenzschichten Proteine beeinflussen.

Der zweite Teil der Arbeit betrifft die erstaunlicherweise noch kaum untersuchten dynamischen Eigenschaften von Grenzschichten. Grenzschichten bilden ein quasi-zweidimensionales, thermodynamisches System und sollten deshalb, in Analogie zum Schall im Dreidimensionalen, ebenfalls die Ausbreitung von Wellen ermöglichen. Dieser Effekt konnte in der Tat bereits in Lipidmonolagen beobachtet werden [6, 7]. Doch obwohl die Pulse potenziell als „Informationsträger“ über weit entfernte Bereiche von Membranen in Betracht kommen, ist deren Anregung, Ausbreitung und Anbindung an die lokalen biochemischen Prozesse praktisch noch unerforscht.

Während das Verhalten von Enzymen und Schall im Dreidimensionalen weitgehend bekannt und theoretisch beschrieben ist, steht dem, trotz hoher Relevanz für natürliche Prozesse, eine große Wissenslücke im Fall von zweidimensionalen biologischen Systemen gegenüber. Deshalb ist das übergeordnete Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der Physik, in der Form des Grenzflächenzustands und der akustischen Pulse, auf die biochemische Funktion von membrangebundenen Enzymen zu untersuchen und mit einem thermodynamischen Ansatz zu

erklären. Wie wir sehen werden, ermöglicht erst der „richtige“ Zustand der Grenzschicht biochemische Vorgänge. Die Arbeit ist dabei wie folgt aufgebaut:

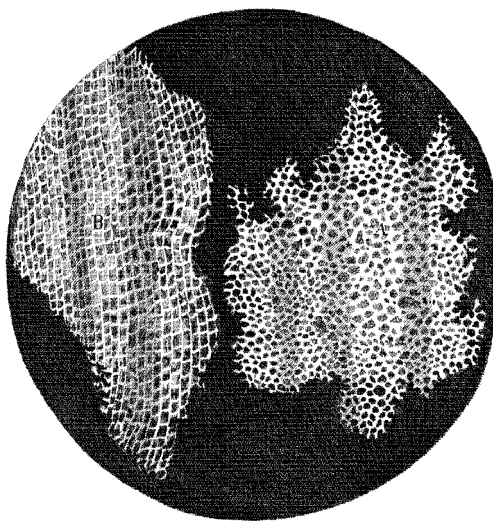
In Kapitel 2 werden zunächst die biologischen, chemischen und physikalischen Grundlagen von Membranen diskutiert. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf einer entropischen Beschreibung von Grenzschichten, die als Ausgangspunkt für die spätere Interpretation der Versuchsergebnisse dienen wird. Abgesehen davon, werden dort die in der Arbeit verwendeten Methoden vorgestellt.

Das dritte Kapitel ist der Zustandsabhängigkeit zweier Enzyme gewidmet. Anhand der Enzyme Katalase und Meerrettichperoxidase wird nachgewiesen, dass die Enzymaktivität direkt vom Phasenzustand der Grenzschicht abhängt. Außerdem wird ein theoretisches Modell vorgestellt, das einen möglichen Erklärungsansatz hierfür bietet.

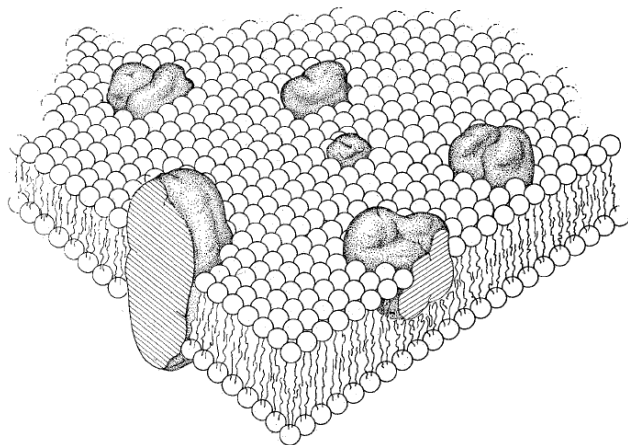
Kapitel 4 behandelt die dynamischen Eigenschaften der Grenzschichten. Mit Hilfe von lokalen pH- bzw. Temperaturänderungen werden akustische Pulse in Lipidmonolagen ausgelöst. Die Pulse verändern kurzzeitig die mechanischen, elektrischen und chemischen Eigenschaften der Grenzschicht. Motiviert durch diese Ergebnisse wird abschließend ein neues Modell zur Signaltransduktion vorgeschlagen und anhand der Enzyme Acetylcholinesterase und Phospholipase A₂ im fünften Kapitel überprüft und verifiziert.

2. Biologische Membranen

Der Entdeckung der Zelle ging, wie so oft in der Menschheitsgeschichte, eine technologische Erfindung voraus: das Mikroskop. Vermutlich wurde das erste Mikroskop Anfang des 17. Jahrhunderts von den Holländern Zacharias Janssen und seinem Vater Hans Janssen konstruiert. Einige Jahrzehnte später entwickelte Robert Hooke (1635–1703) ein eigenes Auflichtmikroskop, womit er verschiedene biologische Proben sorgfältig abzeichnete und beschrieb. Beim Studium einer sehr fein geschnittenen Korkprobe fiel ihm auf, dass diese aus vielen kleinen Poren bestand und eine Bienenwaben ähnliche Struktur besaß (siehe Abb. 2.1a) [8]. Diese Assoziation veranlasste ihn dazu, den Poren ihren heute üblichen Namen zu verleihen - Zelle:



(a) Aufbau von Kork



(b) Membranaufbau

Abbildung 2.1.: Grundlegende Arbeiten zum Zellaufbau: (a) Kupferstich aus der *Micrographia* von Robert Hooke [8]. Beim Studium dünner Korkscheiben bemerkte Hooke die Porosität der Probe und gab den einzelnen Poren den Namen „Zelle“. Sein veröffentlichtes Buch mit den detailgetreuen Skizzen kleiner Tiere und Pflanzen avancierte schnell zum Bestseller und verlieh der Mikroskopie einen weltweiten Schub. (b) Das Flüssig-Mosaik-Modell nach Singer und Nicolson [9]: Die Lipide liegen als Doppelschicht vor und bilden damit das strukturelle Rückgrat der Membran. Eingebettet sind zahlreiche Proteine und Peptide, die entweder die gesamte Membran durchspannen, an eine Schicht gebunden sind oder an der Oberfläche haften (aus [9]).

2. Biologische Membranen

“I took a good clear piece of Cork, and with a Pen-knife sharpen’d as keen as a Razor, I cut a [...] exceeding thin piece of it, and placing it on a black object plate, [...] I could exceeding plainly perceive it to be all perforated and porous, much like a Honey-comb, but that the pores of it were not regular [...] these pores, or cells [...] were indeed the first microscopical pores I ever saw, and perhaps, that were ever seen.“

Was Hooke eigentlich beobachtet hatte, waren die Zellwände, nicht deren vollgepacktes Inneres. Die Zellwände trennen das Zellinnere (Zytoplasma) vom extrazellulären Milieu. Durch die selektiv permeable Membran können biochemische Vorgänge gezielt gesteuert werden. Dieser Effekt wird auch von den Organellen, wie zum Beispiel Zellkern, Mitochondrien, Golgi-Apparat etc. ausgenutzt und ermöglicht so eine „Arbeitsteilung“ innerhalb der Zelle.

Physikalisch gesehen sind Membranen Grenzflächen, die eine große Zahl an Wassermolekülen binden. Zusammen mit den freien Proteinen in der Zelle, die ebenfalls viel Wasser binden, führt dies dazu, dass nur ca. 20 % des gesamten Wassers innerhalb einer Zelle frei beweglich ist [10]. Das Bewusstsein für die Existenz einer Plasmamembran entwickelte sich langsam gegen Ende des 19. Jahrhunderts. Ernest Overton untersuchte damals die Permeabilität von Zellen bezüglich verschiedener Stoffe. Seine Erkenntnis, dass die Durchlässigkeit der Zelle für bestimmte Moleküle stark mit deren Öl/Wasser-Partitionskoeffizienten korreliert (d. h. deren Löslichkeit), wird heute auch als Overton’sche Regel bezeichnet. Diese Experimente führten ihn schließlich auch zu der erstaunlichen Einsicht, dass die „Grenzschichten des Protoplasts“ vermutlich auf die „Erscheinungen der ‚ausgewählten Löslichkeit‘ zurückzuführen sind“ [11]. Damit war die Hypothese, dass die Grenzschichten aus Lipiden aufgebaut sein könnten, geboren. Bis zu den nächsten Beiträgen zur Membrantheorie dauerte es überraschend lange. 1925 gelang es Gorter und Grendel die Lipide eines roten Blutkörperchens zu extrahieren und diese als Monolage auf der Wasseroberfläche einer Filmwaage zu spreiten. Glücklicherweise löschten sich bei ihrer Kalkulation mehrere experimentelle Fehler gegenseitig aus und sie ermittelten erfolgreich den Faktor zwei zwischen der Oberfläche der Monolage und der Oberfläche der Zelle [12]. Ab diesem Zeitpunkt war somit klar, dass die Membran aus einer Doppelschicht von Lipiden aufgebaut sein musste. Ebenfalls auf Filmwaagenexperimente zurückzuführen ist die Hypothese, dass Proteine Teil der Grenzschicht sein könnten [13].

Den nächsten großen Fortschritt brachte wiederum eine technische Neuerung: die Elektronenmikroskopie. Die nachfolgend mögliche starke Vergrößerung von biologischen Proben führte zur Einsicht, dass die Grenzschicht der Organellen analog zur Zellwand aufgebaut sein musste. All diese Ergebnisse mündeten schließlich in dem 1972 vorgeschlagenen „Flüssig-Mosaik-Modell“ von Singer und Nicolson (siehe Abb. 2.1b) [9]. Die grundsätzliche Struktur der Membran wird dabei von einer heterogenen Lipiddoppelschicht gebildet, in der zahlreiche Proteine, wie beispielsweise Rezeptorproteine oder Enzyme, verankert sind. Die Lipide befinden sich in einem fluiden (flüssigen) Zustand, wodurch sie, wie auch die Proteine, frei diffundieren

können. Diese letzte Annahme muss inzwischen teilweise revidiert werden. Die freie Diffusion ist meist nur im Nanometerbereich möglich, da die Membranoberflächen stark segmentiert sind [14]. Dies ist unter anderem auf die Phasenseparation der Lipide, die Agglomeration von Proteinen sowie Verbindungen der Membran mit dem Zytoskelett zurückzuführen. Diese kleinen funktionellen Einheiten auf der Membran sind in der Literatur als „Mikrodomänen“ bekannt und Bestand aktueller Forschung [15]. Im nächsten Abschnitt werden die einzelnen Bestandteile der Membran etwas genauer behandelt.

2.1. Lipide

2.1.1. Der chemische Aufbau

Lipide bilden meist den größten Anteil der Membran. Lipide sind amphiphile Moleküle, d. h. sie besitzen einen hydrophoben (wasserabweisenden) und einen hydrophilen (wasseranziehenden) Teil. (Glycero-)Phospholipide sind dabei mit Abstand die am häufigsten vorkommende Gruppe und bilden beispielsweise mit über 70 % den Hauptbestandteil von Mitochondrien [16]. Weitere wichtige Lipidgruppen sind Sphingolipide, Ganglioside und Cholesterol. Trotz unterschiedlichem chemischen Aufbau besitzen sie sehr ähnliche physikalische Eigenschaften wie die Phospholipide. Da für die Experimente in dieser Arbeit nur Phospholipide verwendet wurden, möchten wir diese etwas genauer diskutieren: Die Phospholipide bestehen aus zwei Kohlenwasserstoffketten, die mit einem Glycerin verestert sind (siehe Abb. 2.2). Die Fettsäureketten können unterschiedlich lang sein und ungesättigte Doppelbindungen enthalten. Ungesättigte Doppelbindungen führen zu einem Knick in den Ketten und beeinflussen damit direkt die Fluidität der Membran. Die dritte Esterbindung des Glycerins besteht mit einer Phosphatgruppe, die verschiedene polare Substituenten tragen kann und den Lipiden ihren Namen gibt: Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylglycerol (PG). In den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimenten wurden vor allem PS und PG verwendet (siehe Abb. 2.2). Die Kopfgruppen besitzen oft protonierbare Gruppen, die je nach lokalem pH-Wert entweder ungeladen (zwitterionisch) oder negativ geladen sind. Beim physiologischen pH-Wert von 7,4 liegen PC und PE zwitterionisch vor, während PI, PS und PG eine negative Ladung tragen [17]. Die vielfältigen strukturellen Kombinationsmöglichkeiten der Lipide führen dazu, dass biologische Membranen meist aus Hunderten von verschiedenen Lipiden bestehen [18]. Der Grund hierfür ist bisher noch nicht vollständig verstanden, auch wenn Einiges auf die Bildung der bereits angesprochenen Mikrodomänen hindeutet und damit der Funktionalisierung der Membranen durch Phasenseparation dienen könnte. Die asymmetrische Verteilung der Lipide in den zwei Monoschichten vergrößert den Spielraum dieses Phänomens schließlich noch weiter.

2. Biologische Membranen

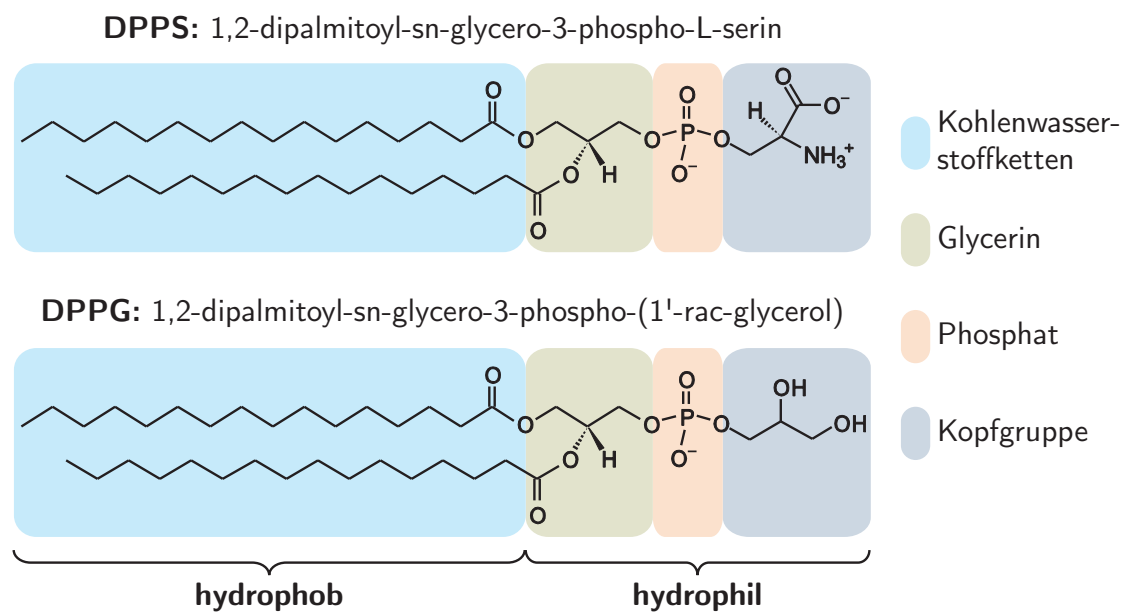


Abbildung 2.2.: Typischer Aufbau von Phospholipiden anhand der Lipide DPPS und DPPG: Die Glyceringruppe bildet das strukturelle Rückgrat der Lipide. Über Esterbindungen sind daran zwei hydrophobe Kohlenstoffwasserstoffketten und eine Phosphatgruppe gebunden. Diese bindet wiederum häufig eine sogenannte Kopfgruppe und bestimmt damit die hydrophilen Eigenschaften des Lipids. Die sogenannte Amphiphilie führt dazu, dass Lipide im Wasser aggregieren und stabile Strukturen bilden.

2.1.2. Die physikalischen Phasenzustände

Die Lipide können ganz ähnlich wie H_2O verschiedene Phasenzustände einnehmen. Im Falle von H_2O wären dies Eis, Wasser und Wasserdampf. Bei Lipiden wird der Zustand grobenteils durch die Kettenordnung bestimmt (siehe Abb. 2.3):

- Bei sehr niedrigen Temperaturen liegen alle Lipide in der **kristallinen Phase** (L_C) vor. Diese Phase zeigt kurz- und langreichweitige Wechselwirkungen in drei Dimensionen, wodurch sie als Kristall beschrieben werden kann. Die Lipide liegen in diesem Fall als hexagonales Gitter vor. Die Fettsäurereste stehen quasi senkrecht zur Grenzschicht und befinden sich in der sogenannten *trans-Konformation*.*
- Bei höheren Temperaturen gehen die Lipide in die **Gel-Phase** ($L_{\beta'}$) über. Die Ketten sind leicht geneigt zur Membranoberfläche (ca. 30°), befinden sich aber weiterhin in der *trans-Konformation*. Die Köpfe verbleiben ebenfalls in einer zweidimensionalen hexagonalen Packung.
- In der **Fluiden-Phase** (L_α) wird die *gauche-Konformation* aufgrund der Entartung gegenüber der *trans-Konformation* immer wahrscheinlicher. Folglich wechselt die Konformation der Ketten ständig zwischen diesen Zuständen hin und her. Die Lipide nehmen dadurch eine größere Fläche ein als zuvor (typische Flächenzunahme $\sim 15\text{--}30\%$) und die übergeordnete Gitterstruktur geht verloren.

Der Hauptübergang zwischen Gel- und Fluiden-Phase ähnelt einem Phasenübergang erster Ordnung, da es hier zu einem Entropiesprung ΔS kommt. Bei konstantem Druck muss eine latente Umwandlungswärme ΔQ aufgewendet werden, um das System vom einen in den anderen Zustand zu überführen. Dies ist wiederum vergleichbar mit dem Schmelzvorgang von Eis zu Wasser:

$$\Delta Q = T_m \Delta S \quad (2.1)$$

Die Übergangstemperatur T_m eines Lipids hängt hauptsächlich von seiner Kettenlänge und der Anzahl der Kohlenstoffdoppelbindungen ab. T_m steigt mit zunehmender Kettenlänge an, während ungesättigte Bindungen T_m stark erniedrigen. Allgemein ist T_m aber eine Funktion aller thermodynamischer Größen, wie z.B. Salzkonzentration, Druck, pH etc. Daher überrascht es auch nicht, dass neben den drei vorgestellten Phasen, je nach Lipid und Hydratation, noch eine Unzahl weiterer Phasen existiert [18]. In der Natur befinden sich die Membranen vorrangig in der Fluiden-Phase, wenige °Celsius oberhalb von T_m . Dies scheint für viele Lebewesen extrem wichtig zu sein, da sie einen großen adaptiven Aufwand betreiben,

*Die Lipidketten können durch Rotationen in den C-C Bindungen verschiedene Konformationen annehmen. In der *trans-Konformation* besitzen die Kohlenstoffatome den größten räumlichen Abstand zueinander (*Zigg-Zagg-Konformation*) und liegen damit im energetisch niedrigsten Zustand vor. Bei höheren Temperaturen können die Kohlenstoffatome in zwei *gauche-Konformationen* übergehen. Diese liegen zwar energetisch auf einem höherem Niveau, sind aber dafür durch die größere Bewegungsfreiheit entropisch favorisiert.

2. Biologische Membranen

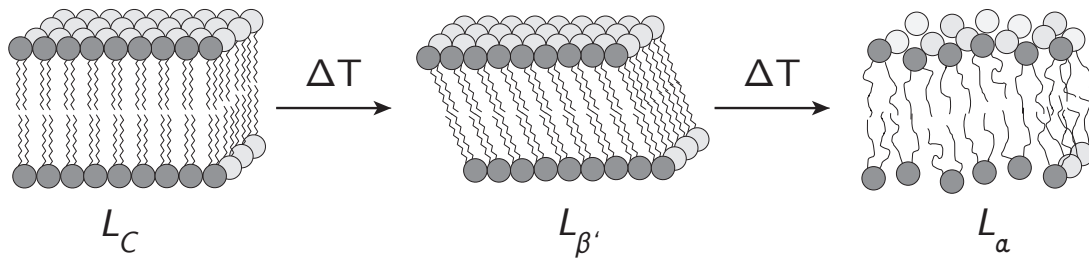


Abbildung 2.3.: Wichtige Phasenzustände von Lipiddoppelschichten: Bei sehr niedrigen Temperaturen besitzt der Phasenzustand der Lipide Ähnlichkeiten mit dem eines Kristalls (L_C). Bei einer Temperaturerhöhung gehen die Lipide in die Gel-Phase über ($L_{\beta'}$). Die Ketten sind leicht geneigt zur Membranoberfläche, doch die strukturelle hexagonale Grundordnung bleibt bestehen. Bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur liegen die Lipide in der Fluiden-Phase (L_{α}) vor. Diese besitzt keine hexagonale Ordnung mehr und die Ketten sind frei beweglich. Der Phasenübergang zwischen der $L_{\beta'}$ - und der L_{α} -Phase wird auch Hauptübergang genannt (adaptiert aus [14]).

um in neuen Umgebungen schnell wieder in diesen Zustand zu gelangen. Das wird typischerweise durch eine Änderung der Lipidzusammensetzung der Membran erreicht. Ein prominentes Beispiel hierfür sind E-Coli Bakterien, die je nach Wachstumstemperatur ihren Anteil an ungesättigten Lipiden variieren und somit ihren Phasenzustand kontrollieren [19]. Dieses Phänomen konnte aber auch bereits in vielen anderen Lebewesen, wie etwa beim Goldfisch oder sogar bei menschlichen Zellen, beobachtet werden [20, 21, 22, 23, 24].

2.2. Proteine und Peptide

Neben den Lipiden stellen Proteine und Peptide einen weiteren wichtigen Bestandteil von (Zell-)Membranen dar. Im Menschen sind sie aus 21 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut. Davon sind acht essenzielle Aminosäuren, was bedeutet, dass wir diese nicht selbst herstellen können, sondern über die Nahrung zu uns führen müssen [10]. Im Körper werden die Aminosäuren zu funktionellen Einheiten verknüpft. Ab einer Länge von ca. 100 Aminosäuren spricht man üblicherweise von Proteinen, während wir kürzere Sequenzen als Peptide bezeichnen. Es ist absolut erstaunlich, zu was diese sehr wenigen Bausteine fähig sind. Je nach sequenzieller Anordnung führen sie zu unterschiedlichen räumlichen Gebilden mit einer riesigen Anzahl verschiedener Funktionen: Proteine können als Rezeptoren Signalstoffe erkennen, für Ionen- und Stoffaustausch zwischen den beiden Membranseiten sorgen, Wachstum und Differenzierung kontrollieren, Bewegung hervorrufen und chemische Reaktionen als Katalysator beschleunigen [10]. Die Funktion der Proteine wird meist durch deren Struktur (Konformation) erklärt. Deshalb werden große Anstrengungen unternommen, um deren molekularen Aufbau herauszufinden. Die erste hochauflösende Strukturaufklärung gelang David Philipps und

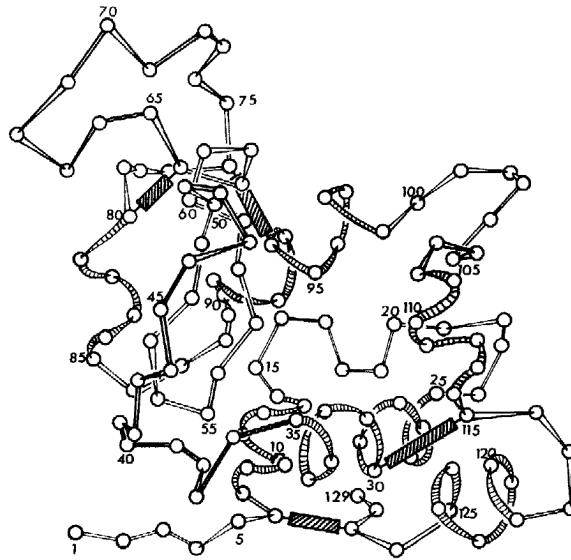


Abbildung 2.4.: Schematische Struktur von Lysozym: 1965 konnte erstmals durch Röntgenstreuung ein hochauflösendes Bild eines Proteins gewonnen werden. Das untersuchte Enzym Lysozym gewannen Philipps und seine Kollegen aus Eiklar. Dort dient es der Abwehr von Bakterien (aus [25]).

seinen Kollegen 1965 [25]. Mittels Röntgenuntersuchungen konnten sie die Struktur von Lysozym vollständig entschlüsseln (siehe Abb. 2.4). Seit diesem Zeitpunkt werden durch fortschreitende technologische Entwicklungen und neue biochemische Verfahren immer mehr Proteine strukturell aufgeklärt. Die Konformation, in der die Proteine ihre physiologische Funktion wahrnehmen, wird nativ genannt. Dabei nimmt das Protein den Zustand mit der geringsten freien Energie ein [10]. Allerdings darf man sich Proteine nicht als starr vorstellen. Durch die enorme Größe der Proteine, die aus bis zu 27 000 Aminosäuren aufgebaut sein können, besitzen sie eine unüberschaubare Zahl an (räumlichen) Freiheitsgraden [10]. Folglich ist der Phasenraum aus einer Unzahl energetisch ähnlich stabiler Zustände aufgebaut. Proteine sind also vielmehr hochdynamische Strukturen, die zeitlich betrachtet thermodynamische Fluktuationen über mehrere Größenordnungen hinweg zeigen [26]. Das Gesamtvolumen variiert dabei nur im geringen Maße ($\frac{\delta V}{V} \approx 0,3\%$), jedoch können einzelne Teilbereiche des Proteins im zweistelligen Prozentbereich fluktuieren [27, 28, 29]. Noch ausgeprägter sind die Fluktuationen der inneren Energie eines Proteins. Diese liegen nur knapp unterhalb der Energie, die nötig ist, um das Enzym zu denaturieren [30, 31].

Thermodynamische Fluktuationen sind unvermeidbar und daher stellt sich die Frage, ob die Natur nicht vielleicht einen Weg gefunden hat, um aus diesem „störenden Rauschen“ Profit zu ziehen. Um dieser Frage nachgehen zu können, werden im nächsten Abschnitt die grundlegenden thermodynamischen Relationen für Grenzflächen behandelt.

2.3. Thermodynamik von Grenzschichten

Die Thermodynamik (Wärmelehre) stellt ein wichtiges Teilgebiet der klassischen Physik dar. Sie ist besonders nützlich bei der Beschreibung von Vielteilchensystemen, auch Ensembles genannt. Mit ihr lassen sich Aussagen über die physikalischen Eigenschaften eines Systems ableiten, ganz ohne die Notwendigkeit eines molekularen Modells. Der erste Hauptsatz der Thermodynamik beinhaltet die Energieerhaltung eines Systems:

$$dU = \delta Q + \delta W = \delta Q - \pi dA + \psi dq + \sum_i \mu_i dN_i + \dots \quad (2.2)$$

Die Änderung der inneren Energie U ist gleich der Änderung von Wärme Q und Arbeit W . Die Art der verrichteten Arbeit hängt dabei vom System ab. In den später behandelten Experimenten handelt es sich meist um Flächenarbeit $-\pi dA$ ($\pi \equiv$ Lateraldruck, $A \equiv$ Fläche), Ladungsarbeit ψdq ($\psi \equiv$ Oberflächenpotential, $q \equiv$ Ladung) oder um die teilchenabhängige chemische Arbeit $\mu_i dN_i$ ($\mu \equiv$ chemisches Potential, $N \equiv$ Teilchenzahl). Die innere Energie ist eine Zustandsfunktion. Das heißt, das Differenzial dU ist wegunabhängig und hängt folglich nicht von seiner Vorgeschichte ab.

Einstein war überzeugt, dass die Thermodynamik die einzige physikalische Theorie ist, die nie an Gültigkeit verlieren wird [32]. So verwundert es auch nicht, dass viele seiner bahnbrechenden Arbeiten von einer thermodynamischen Beschreibung eines bestimmten Systems ausgingen. Beispielsweise erkannte er 1901 in seiner allerersten Publikation, dass der Oberfläche eines Wassertropfens „eine eigene spezifische Wärme“ zugeordnet werden muss [33]. Folglich besitzt jede Grenzschicht, also unter anderem auch jede Membran, eine Eigenentropie und kann als thermodynamisch unabhängiges System betrachtet werden [34]. Rudolf Clausius definierte 1865 als Erster den Entropiebegriff. Den Startpunkt seiner Überlegung bildete ein reversibler Kreisprozess. Bei reversiblen Prozessen müssen sich am Ende alle Wärmeänderungen aufheben ($\oint \delta Q_{rev}/T = 0$). Dieser Zustandsfunktion gab er den Namen Entropie:

$$dS = \frac{\delta Q_{rev}}{T} \quad (2.3)$$

Aus dieser Definition folgt direkt, dass die Entropie bei adiabatischen Prozessen ($\delta Q = 0$) erhalten bleibt (\equiv isentropische Prozesse). Das Entropiepotential S wird durch seine thermodynamischen Variablen n_i vollständig beschrieben und kann an einem Punkt durch eine Taylorreihenentwicklung genähert werden:

$$S(n_i) = S_0 + \sum_i \frac{\partial S}{\partial n_i} \cdot \delta n_i + \frac{1}{2} \sum_i \sum_j \frac{\partial^2 S}{\partial n_i \partial n_j} \cdot \delta n_i \delta n_j + \dots \quad (2.4)$$

Die ersten Ableitungen $\frac{\partial S}{\partial n_i}$ entsprechen den thermodynamischen Kräften und treiben das

2.3. Thermodynamik von Grenzschichten

System zurück in Richtung Gleichgewicht, d. h. in Richtung des Entropiemaximums. Die zweiten Ableitungen $\frac{\partial^2 S}{\partial n_i \partial n_j}$ entsprechen den thermodynamischen Fluktuationen des Systems (z. B. Volumen-, Flächen- oder Ladungsfluktuationen). Neben dieser phänomenologischen Einführung der Entropie leitete Boltzmann 12 Jahre nach Clausius eine äquivalente statistische Definition der Entropie ab [35]:

$$S = -k_B \cdot \ln P \quad (2.5)$$

k_B entspricht der Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K) und P der Zahl der Realisierungsmöglichkeiten des derzeitigen Mikrozustandes oder anders ausgedrückt dessen Wahrscheinlichkeit. Um die Entropie eines Systems zu berechnen, müsste man laut Einstein „eine vollständige molekular-mechanische [...] Theorie“ besitzen [36]. Deshalb erschien ihm die Gleichung in dieser Form „vom phänomenologischen Standpunkt aus betrachtet inhaltslos.“ Er schlägt stattdessen vor umgekehrt vorzugehen – aus den thermischen Eigenschaften des Systems die zugehörigen Entropiewerte zu berechnen und daraus mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung (Gleichung 2.5) die Wahrscheinlichkeitsverteilung des derzeitigen Zustands zu bestimmen [37]. Die Verbindung zwischen den thermodynamischen Eigenschaften des Systems und dem Entropiepotential wird deutlich, indem man die Wahrscheinlichkeitsverteilung einer Observable n_i im Gleichgewicht betrachtet. Für die Herleitung folgen wir weitgehend der Arbeit von Landau und Lifshitz [38]. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Observable n_i zwischen n_i und $n_i + dn_i$ liegt, ist gegeben durch:

$$P(n_i) dn_i = \exp\left(-\frac{S(n_i)}{k_B}\right) dn_i \quad (2.6)$$

Mit Hilfe der Taylorentwicklung aus Gleichung 2.4, $\beta = -\frac{1}{k_B} \frac{\partial^2 S}{\partial n_i^2}$, der Randbedingung $\int_{-\infty}^{+\infty} P(n_i) dn_i = 1$, sowie der Annahme, dass sich das System im Gleichgewicht befindet ($\partial S / \partial n_i = 0 \Rightarrow S(n_i) = S(0) - \frac{1}{2} \beta n_i^2$), erhält man:

$$P(n_i) dn_i = \sqrt{\frac{\beta}{2\pi}} \cdot \exp\left(-\frac{\beta n_i^2}{2}\right) dn_i \quad (2.7)$$

Die Wahrscheinlichkeit der verschiedenen Mikrozustände der Observable n_i ist also Gaußverteilt. Die mittleren quadratischen Fluktuationen ergeben sich mit dieser Normalverteilung zu:

$$\langle (\delta n_i)^2 \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} (\delta n_i)^2 \cdot P(n_i) dn_i = \beta^{-1} = -k_B \left(\frac{\partial^2 S}{\partial n_i^2} \right)^{-1} \quad (2.8)$$

Dadurch stellt sich die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Observable n_i im Gleichgewicht wie folgt dar:

$$P(n_i) dn_i = \sqrt{\frac{1}{2\pi \langle (\delta n_i)^2 \rangle}} \cdot \exp\left(-\frac{n_i^2}{2 \langle (\delta n_i)^2 \rangle}\right) dn_i \quad (2.9)$$

2. Biologische Membranen

n_i wird im Laufe der Zeit alle Werte annehmen, die durch diese Wahrscheinlichkeitsverteilung und damit vom Entropiepotential vorgegeben sind. Sind die Fluktuationen $\langle(\delta n_i)^2\rangle$ der Observablen groß, entspricht dies einer breiten Gauß-Verteilung und damit einem schwach gekrümmten Entropiepotential (vgl. Gleichung 2.8). Umgekehrt entsprechen kleine Fluktuationen einem stark gekrümmten Entropiepotential und demzufolge einer sehr schmalen Wahrscheinlichkeitsverteilung. Betrachtet man mehr als eine Observable folgt analog für die gekoppelten Fluktuationen der Variablen n_i und n_j :

$$\langle\delta n_i \delta n_j\rangle = -k_B \left(\frac{\partial^2 S}{\partial n_i \partial n_j} \right)^{-1} = -k_B \left(\frac{\partial n_i}{\partial N_j} \right)_{N_{k \neq j}} \quad (2.10)$$

Die zweite Ableitung der Entropie wird auch als Suszeptibilität bezeichnet und ist das Bindeglied zu den experimentell bestimmbar Größen. N_j sind die zu n_j konjugierten intensiven Größen, wie zum Beispiel: $\frac{1}{T}$ bzgl. H , $\frac{\pi}{T}$ bzgl. A und $-\frac{\mu}{T}$ bzgl. q . Für die mittleren Fluktuationen der Fläche A , der Enthalpie H und der Ladung q folgt aus Gleichung 2.10:

$$\langle(\delta A)^2\rangle = -k_B \left(\frac{\partial^2 S}{\partial A^2} \right)^{-1} = k_B \left(-\frac{1}{T} \frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T^{-1} = k_B A T \kappa_T \quad (2.11)$$

$$\langle(\delta H)^2\rangle = -k_B \left(\frac{\partial^2 S}{\partial H^2} \right)^{-1} = k_B \left(T^2 \frac{\partial T}{\partial H} \right)_\pi^{-1} = k_B T^2 c_\pi \quad (2.12)$$

$$\langle(\delta A \delta H)\rangle = -k_B \left(\frac{\partial^2 S}{\partial A \partial H} \right)^{-1} = k_B \left(T^2 \frac{\partial T}{\partial A} \right)_\pi^{-1} = k_B T^2 A \alpha_\pi \quad (2.13)$$

$$\langle(\delta q)^2\rangle = -k_B \left(\frac{\partial^2 S}{\partial q^2} \right)^{-1} = k_B \left(\frac{1}{T} \frac{\partial \psi}{\partial q} \right)_{T,A}^{-1} = k_B T C_T \quad (2.14)$$

Die dabei verwendeten thermodynamischen Messgrößen sind wie folgt definiert:

$$\kappa_T = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T \quad c_\pi = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_\pi \quad \alpha_\pi = \frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial T} \right)_\pi \quad C_T = \left(\frac{\partial q}{\partial \psi} \right)_T \quad (2.15)$$

Die Fluktuationen des Entropiepotentials in der Fläche A , der Enthalpie H und der Ladung q sind somit proportional zur isothermen Kompressibilität κ_T , zur Wärmekapazität c_π und zur elektrischen Kapazität C_T . Die gekoppelten Flächen- und Enthalpiefluktuationen sind der Ursprung des Wärmeausdehnungskoeffizienten α_π . κ_T und α_π können beispielsweise mit der Filmwaagentechnik gemessen werden (siehe Abschnitt 2.5). c_π kann kalorimetrisch und C_T mittels eines Oberflächenpotentiometers bestimmt werden. Je nachdem welche Parameter konstant gehalten werden, ergeben sich immer neue Identitäten für die Fluktuationen. Lassen wir beispielsweise pH-Änderungen zu, wird aus Gleichung 2.14:

$$\langle(\delta q)^2\rangle = k_B \left(\frac{1}{T} \frac{\partial \mu}{\partial q} \right)_{T,A}^{-1} = k_B T \left(\frac{\partial q}{\partial p} \right)_{T,A} \left(\frac{\partial p}{\partial \mu} \right)_{T,A} = \frac{k_B T q^2}{A} \kappa_T \quad (2.16)$$

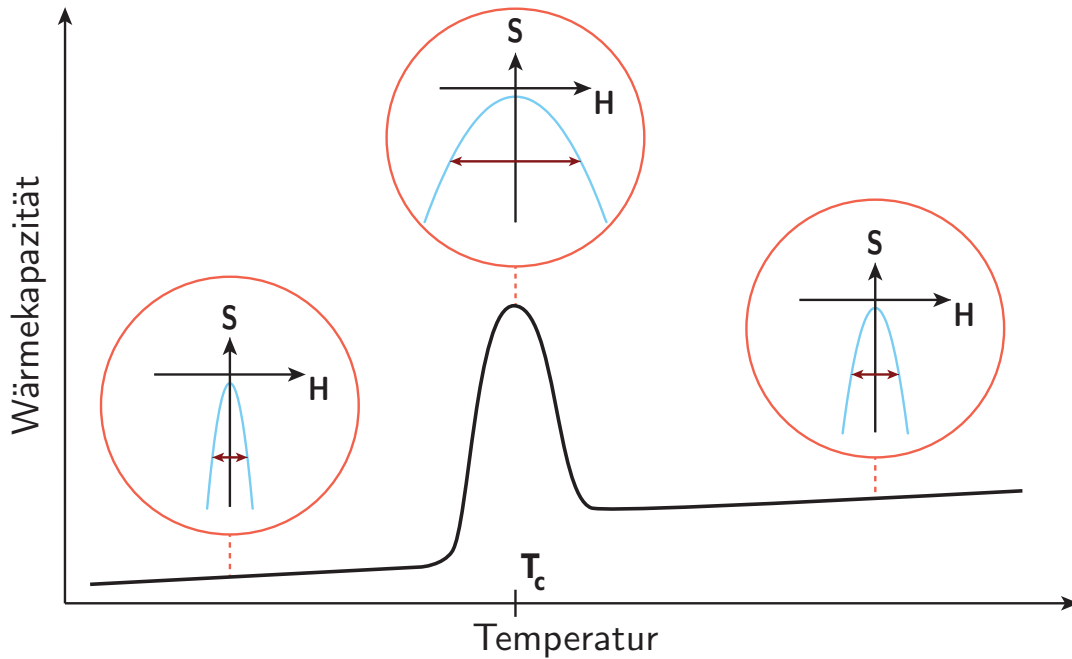


Abbildung 2.5.: Schematische Wärmekapazitätskurve eines Proteins: Je nach Temperatur verändert sich die Wärmekapazität eines Proteins deutlich. Bei einer kritischen Temperatur T_c nimmt sie ein Maximum an. Dies ist auf ein extrem weites Entropiepotential und damit auf große Enthalpiefluktuationen des Proteins zurückzuführen. In den anderen Temperaturbereichen ist das Entropiepotential deutlich schmäler. Folglich steht dem Protein hier eine wesentlich geringere Anzahl an Mikrozuständen zur Verfügung, die es mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen kann.

Im Falle einer Druckänderung bei konstanter Fläche und Temperatur sind die Ladungsfluktuationen somit proportional zur Kompressibilität und damit zu den mechanischen Eigenschaften der Grenzschicht [39]. Wie wir später sehen werden, ist dieser Zusammenhang kein Zufall, sondern die Suszeptibilitäten korrelieren alle miteinander.

Zur Veranschaulichung des Zusammenhangs zwischen den Messgrößen und dem Entropiepotential, ist in Abbildung 2.5 eine schematische Wärmekapazitätskurve eines Proteins dargestellt. Die Entropiepotentiale unterscheiden sich je nach Zustand deutlich voneinander. Um ein besseres Gefühl für die typischen Größenordnungen von Proteinfluktuationen zu bekommen, berechnen wir diese nun anhand experimenteller Daten. Dabei halten wir uns grobenteils an die Abschätzungen von Alan Cooper [30, 31, 40]. Proteine besitzen außerhalb ihres Phasenübergangs, der als Denaturierungsübergang bezeichnet wird, eine mittlere Wärmekapazität von ca. $0,3 \text{ cal/K/g}$ [41]. Nach Gleichung 2.12 bedeutet dies für ein Protein mit einem Gewicht von 25 kDa durchschnittliche Enthalpiefluktuationen ($\sqrt{\langle(\delta H)^2\rangle}$) von $6 \cdot 10^{-20} \text{ Kalorie/Molekül}$ oder fast 40 kcal/mol . Diese Enthalpiefluktuationen machen nur wenige Prozent der Gesamtenergie des Proteins aus ($\sim 10^3 \text{ kcal/mol}$), trotzdem liegen sie damit

2. Biologische Membranen

nur knapp unterhalb der thermischen Energie, die zur Denaturierung von Proteinen ausreicht ($40 - 200 \text{ kcal/mol}$) [31]. Zudem befinden sie sich im Bereich typischer Aktivierungsenergien, wie sie bei enzymatisch katalysierten Reaktionen auftreten [5, 42, 43]. Auf diesen Punkt werden wir in Kapitel 3 noch einmal zurückkommen.

Nun zurück zu Einsteins Idee: Durch die Messung der thermodynamischen Größen (κ_T , c_π , C_T ...) kann man auf das systembeschreibende Entropiepotential zurückschließen und die Wahrscheinlichkeitsverteilung des derzeitigen Zustands berechnen. Aus den Gleichungen 2.11 – 2.14 folgt, dass der Ursprung der experimentellen Messgrößen auf die Fluktuationen der Observablen zurückgeht. Starke Fluktuationen bedingen damit große Messgrößen. Beispielsweise führen starke Flächenfluktuationen der Lipide $\langle(\delta A)^2\rangle$ zu einer großen Ableitung in $\frac{\partial A}{\partial \pi}$ (vgl. Gleichung 2.11) und damit zu einem großen Wert für κ_T . Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Molekülfläche entspricht somit einer sehr breiten Gauß-Verteilung (vgl. Gleichung 2.9). Daraus ergibt sich die Frage, wodurch die Fluktuationen eines Systems bestimmt sind.

Aus theoretischer Sicht ist hierfür der physikalische Zustand des Systems verantwortlich. Besonders interessante Bereiche stellen Phasenübergänge dar. Bei einem Phasenübergang erster Ordnung tritt bei einer bestimmten Temperatur eine latente Wärme ΔQ auf. Diese ist mit einer divergierenden Wärmekapazität verbunden und folglich mit unendlich großen Fluktuationen des Systems. In reellen Systemen erstreckt sich der Phasenübergang jedoch immer über einen bestimmten (Temperatur-)Bereich und erfolgt nicht instantan. Die Fluktuationen im System nehmen währenddessen deutlich zu und es kommt zu einer Überschusswärmekapazität Δc . Bei Phasenübergängen zweiter Ordnung tritt ein Sprung in der Wärmekapazität auf, was ebenfalls eine Zunahme der Fluktuationen nach sich zieht. Aus der Phänomenologie von Phasenübergängen erster Ordnung können noch weitere Folgerungen abgeleitet werden: So verhalten sich die ersten Ableitungen der Observablen im Phasenübergang der Membran (z. B. $\frac{\partial A}{\partial \pi}$ oder $\frac{\partial q}{\partial \psi}$) **alle** weitgehend linear bei Temperaturänderungen [44]. Dadurch kann nachgewiesen werden, dass die Änderungen der Messgrößen in diesem Bereich proportional zueinander sind [44]:

$$\Delta \kappa_T \propto \Delta c_\pi \propto \Delta C_T \propto \Delta \alpha_\pi \quad (2.17)$$

Die Suszeptibilitäten korrelieren also im Phasenübergang miteinander. Ändert sich eine dieser Größen, ändern sich alle anderen unweigerlich mit. Die Proportionalitätsfaktoren zwischen den Messgrößen lassen sich experimentell ermitteln. Das kann ausgenutzt werden, um schwierig zu bestimmende Größen, wie z. B. c_π , aus leichter zugänglichen Größen, wie beispielsweise κ_T , abzuschätzen [44, 45].

2.4. Elektrostatik von Grenzflächen

Wie bereits angesprochen, besitzen alle Lipide entweder eine zwitterionische oder eine negativ geladene Kopfgruppe. Neben den Lipiden tragen meist auch Proteine zur Oberflächenladung der Membran bei. Die Ableitung der elektrostatischen Relationen wollen wir im Folgenden anhand des Beispiels einer reinen Lipidgrenzfläche diskutieren, auch wenn die meisten Ergebnisse für alle geladenen Flächen gelten.

Die Grenzflächenladung führt in Salzlösungen dazu, dass sich lokal an der Membran Ionen ansammeln und das von den Lipiden (und Proteinen) erzeugte elektrische Feld weitgehend abschirmen. Potential ψ und Ladungsdichte $\rho(\mathbf{r})$ sind über die Poisson-Gleichung verknüpft:

$$\Delta\psi = -\frac{\rho(\mathbf{r})}{\varepsilon\varepsilon_0} \quad (2.18)$$

ε_0 entspricht der Vakuum-Permittivität ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{ AsV}^{-1}\text{m}^{-1}$) und ε der relativen Permittivität (≈ 80 für Wasser). Sofern die genaue Ladungsverteilung bekannt ist, kann folglich der Potentialverlauf bestimmt werden. Die Ionen sind frei beweglich und ordnen sich anhand der Boltzmann-Ladungsverteilung an der Membran aus. Die Konzentration des i -ten Ions c_i im Abstand \mathbf{r} von der Grenzfläche ist gegeben durch [46]:

$$c_i(\mathbf{r}) = c_i^0 \cdot \exp\left(-\frac{W_i(\mathbf{r})}{k_B T}\right) = c_i^0 \cdot \exp\left(-\frac{z_i e \psi(\mathbf{r})}{k_B T}\right) \quad (2.19)$$

$W_i = z_i e \psi$ entspricht dabei der Arbeit, die benötigt wird um das Ion i mit der Valenz (Ladungszahl) z_i bis zu einem bestimmten Potentialwert an die Membran heranzubringen. e entspricht der Elektronenladung ($1,60 \cdot 10^{-19} \text{ C}$) und c_i^0 der Ionenkonzentration im Bulk. Da Protonen ebenfalls dieser Gleichung gehorchen, folgt unmittelbar, dass der pH an einer Grenzfläche mit negativem Potential geringer sein muss als im Bulk. Dieser Effekt ist auch für Membranen von Bedeutung. In biologischen Systemen summiert sich der pH-Unterschied zwischen Grenzschicht und Bulk auf: $\Delta\text{pH} \approx 1\text{--}3$ [10].

Im Gleichgewicht stellt sich überall an der Membran der selbe Potentialverlauf ein. Daher kann die Betrachtung der Poisson-Gleichung auf eine Dimension vereinfacht werden. Mit der Ladungsverteilung $\rho(\mathbf{x}) = \sum_i e z_i c_i$ erhalten wir die sogenannte eindimensionale Poisson-Boltzmann-Gleichung:

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = -\sum_i \frac{e z_i c_i^0}{\varepsilon\varepsilon_0} \cdot \exp\left(-\frac{z_i e \psi}{k_B T}\right) \quad (2.20)$$

Falls nur monovalente Ionen, wie in den hier vorgestellten Experimenten, verwendet werden ($z_i = \pm 1$) kann die Formel 2.20 weiter vereinfacht werden. Die Integration mit der Nebenbe-

2. Biologische Membranen

dingung $(d\psi/dx)_{x \rightarrow \infty} = 0$ ergibt:

$$\frac{d\psi}{dx} = -\sqrt{\frac{8k_B T c_i^0}{\varepsilon \varepsilon_0}} \cdot \sinh\left(\frac{e\psi}{2k_B T}\right) \quad (2.21)$$

Mit $\psi(x=0) = \psi_0$ kann Gleichung 2.21 integriert werden zu:

$$\psi(x) = \frac{2k_B T}{e} \cdot \ln \left[\frac{1 + \gamma \exp(-\kappa x)}{1 - \gamma \exp(-\kappa x)} \right]; \quad \gamma \equiv \tanh\left(\frac{e\psi_0}{4k_B T}\right); \quad \kappa^{-1} \equiv \sqrt{\frac{\varepsilon \varepsilon_0 k_B T}{2e^2 c_i^0}} \quad (2.22)$$

$\kappa^{-1} = \lambda_D$ entspricht dabei der Debye-Länge. Sie gibt an, bei welchem Abstand von der Grenzfläche das Potential auf $1/e$ des ursprünglichen Wertes abgefallen ist. In den Experimenten dieser Arbeit werden typischerweise Elektrolytkonzentrationen von 0,1–0,01 mol/l verwendet. Damit folgt für λ_D der Wertebereich 0,96–3,1 nm. ψ besitzt damit eine ähnliche räumliche Ausdehnung wie die Membran selbst. Außerhalb von λ_D spüren geladene Objekte, wie z. B. Proteine oder Ionen, kaum mehr den Einfluss des Grenzflächenpotentials. Die Ladungen der Grenzfläche müssen zusammen mit den Ladungen im Bulk Null ergeben (Elektroneutralitätsbedingung). Dadurch kann eine Beziehung zwischen der Oberflächenladung σ und ψ hergestellt werden:

$$\sigma = - \int_0^\infty \rho(x) dx = -\varepsilon \varepsilon_0 \int_0^\infty \frac{d^2\psi}{dx^2} dx = -\varepsilon \varepsilon_0 \left. \frac{d\psi}{dx} \right|_{x=0} \quad (2.23)$$

Mit Gleichung 2.21 folgt daraus die sogenannte „Grahame-Gleichung“ [47]:

$$\sigma = \sqrt{8c_i^0 \varepsilon \varepsilon_0 k_B T} \cdot \sinh\left(\frac{e\psi_0}{2k_B T}\right) \quad (2.24)$$

Je nach Salzkonzentration c_i^0 ergibt sich somit eine unterschiedliche Oberflächenladung σ . Neben c_i^0 bestimmt aber vorrangig der pH den Dissoziationsgrad α der Lipide. Dieser ist abhängig von der sogenannten Säurekonstante K_S der Lipide. Sie ist ein Maß dafür, wie stark ein Lipid bei einem bestimmten pH-Wert (de-)protoniert ist. Der negativ dekadische Logarithmus von K_S wird pK_S -Wert genannt. Er gibt an, bei welchem pH-Wert genau 50 % der Lipide geladen bzw. protoniert sind:

$$\alpha = \frac{[Lipid^-]}{[Lipid^-] + [Lipid]}; \quad K_S = \frac{[Lipid^-][H^+]}{[Lipid]}; \quad pK_S = -\log\left(\frac{[Lipid^-][H^+]}{[Lipid]}\right) \quad (2.25)$$

Für die Oberflächenladung σ gilt:

$$\sigma = -\frac{e\alpha}{A} \quad (2.26)$$

Mit bekanntem Dissoziationsgrad α lässt sich aus Gleichung 2.24 das Oberflächenpotential ψ

2.5. Untersuchung von Lipidmonolagen mittels der Filmwaagentechnik

einer geladenen Lipidschicht abschätzen:

$$\psi = -\frac{2k_B T}{e} \cdot \sinh \left[\left(\frac{\alpha}{A\sqrt{c_i^0}} \right) \left(\frac{e}{\sqrt{8\varepsilon\varepsilon_0 k_B T}} \right) \right] \quad (2.27)$$

Diese Gleichung wird später dazu verwendet das experimentell bestimmte Oberflächenpotential mit den theoretischen Werten der Gouy-Chapman-Theorie zu vergleichen [47, 48].

2.5. Untersuchung von Lipidmonolagen mittels der Filmwaagentechnik

Die Filmwaage ist die zentrale Analysemethode dieser Arbeit. Sie birgt viele Vorteile gegenüber anderen Methoden. So werden nur geringste Mengen an Lipiden und Proteinen benötigt, um Experimente durchzuführen. Darüber hinaus können damit die optischen, chemischen, elektrischen und mechanischen Eigenschaften des Systems über einen weiten Bereich hinweg gezielt manipuliert werden. Dadurch lässt sich der Zustand der Grenzschicht exakt einstellen und bestimmen. Im Folgenden wird kurz die Historie der Filmwaage und deren Funktionsweise vorgestellt.

2.5.1. Geschichte und Prinzip der Filmwaagentechnik

Wie bereits angesprochen, gehen wichtige Erkenntnisse in der Membrantheorie, wie beispielsweise die Doppelschichtstruktur der Membran oder deren Aufbau aus Proteinen und Lipiden, auf Filmwaagenexperimente zurück [12, 13]. Das Messprinzip ist sehr einfach und basiert auf einer Alltagserscheinung. Bringt man oberflächenaktive Substanzen auf eine Wasseroberfläche auf, bilden sie dort eine Monolage aus, was mit einer Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers einhergeht. Man kennt dieses Phänomen unter anderem von verunreinigten Gewässern. Gelangen Wasch- oder Spülmittel in natürliche Gewässer, verringern sie unweigerlich die Oberflächenspannung des Wassers und entziehen somit einer Vielzahl von Tieren, wie beispielsweise Wasserläufern, die Lebensgrundlage. Die ersten Experimente bezüglich dieses Phänomens gehen auf Benjamin Franklin zurück. 1773 schildert er in einem Brief an seinen Freund William Brownrigg sehr anschaulich den Effekt von Öl auf eine Teichoberfläche [49]:

“At length being at Clapham, where there is, on the Common, a large Pond, which I observed to be one Day very rough with the Wind, I fetched out a Cruet of Oil, and dropt a little of it on the Water. I saw it spread itself with surprising Swiftness upon the Surface, [...] and there the oil tho’ not more than a Tea Spoonful produced an instant Calm. [...] If a Drop of Oil is put on a polished Marble Table, or on a Looking Glass that lies horizontally; the Drop remains in its Place, spreading very little. But when put on Water it spreads instantly many feet round, becoming so

2. Biologische Membranen

thin as to produce the prismatic Colours, for a considerable Space, and beyond them so much thinner as to be invisible except in its Effect of smoothing the Waves at a much greater Distance.“

Ein Jahrhundert später bestimmte Agnes Pockels mittels einer Schiebewaage erstmals die Oberflächenspannung von Wasser in Abhängigkeit von dessen Verschmutzungsgrad [50, 34]. Dabei variierte sie die Fläche des Troges mit einem Zinnstreifen und konnte so in nachfolgenden Arbeiten die erste jemals gemessene Oberflächenspannungs-Druck-Kurve präsentieren [51, 52].

Das Messprinzip heutiger Filmwaagen basiert immer noch auf diesen ersten Experimenten. Um Verunreinigungen vorzubeugen, besteht der verwendete Filmwaagenaufbau aus dem chemisch inerten Polytetrafluorethylen (Teflon) (siehe Abb. 2.6). Für Messungen wird der Teflontrog mit Reinstwasser (Leitwiderstand $> 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$) oder einer vorbereiteten Salzlösung gefüllt und eine definierte Menge lipidhaltiges Lösungsmittel aufgetropft. Dabei handelt es sich entweder um Chloroform oder um ein Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch. Die Lipide breiten sich auf der gesamten Wasseroberfläche aus und bilden nach dem Abdampfen des flüchtigen Lösungsmittels eine geschlossene einlagige Schicht (Monolage). Die hydrophilen Kopfgruppen interagieren mit dem Wasser, während die hydrophoben Fettsäureketten in die Luft gerichtet sind. Die Temperatur des Systems wird mit einem angeschlossenen Wärmebad kontrolliert. Des Weiteren ist die Filmwaage mit zwei individuell beweglichen Barrieren ausgestattet. Durch Kompression oder Expansion der eingeschlossenen Fläche, kann die Oberflächendichte der Lipide beliebig variiert werden. Die Lipidmonolage führt zu einem „Lateraldruck“ π auf die Barrieren. π entspricht der Differenz zwischen der Oberflächenspannung der reinen Subphase σ_0 und der Oberflächenspannung der mit Lipid bedeckten Subphase σ [53]:

$$\pi = \sigma_0 - \sigma \quad (2.28)$$

σ_0 hängt von der Temperatur, Ionen, pH etc. ab und beträgt im Fall von Reinstwasser $72,8 \text{ mN/m}$ bei 20°C [53]. Zur Messung des Lateraldrucks π kommt ein sogenanntes Wilhelmy-Plättchen zum Einsatz. Dabei handelt es sich um ein Filterpapier, das ins Wasser hängt und vollständig benetzt. Die Kraft, die darauf wirkt, ist proportional zur Oberflächenspannung und wird von einem Oberflächendrucksensor ausgelesen (*NIMA, Typ PS4, Coventry, England*). Gleichzeitig kann mit Hilfe einer Kelvinsonde (*TREK, Model 325, New York, USA*) das elektrische Oberflächenpotential V^{tot} der Grenzschicht aufgezeichnet werden. Im Boden der Filmwaage ist ein kreisförmiges Quarzglas eingelassen ($d = 20 \text{ mm}$). Dies ermöglicht optische Messungen am System, wie beispielsweise die konzentrationsabhängige Absorption eines Reaktionsprodukts.

In der Regel wird die Filmwaage zur Aufnahme von Isothermen verwendet. Dabei wird bei konstanter Temperatur der Oberflächendruck π als Funktion der Fläche A ermittelt. Aus der resultierenden Kurve $\pi(A)$ kann das Phasenverhalten der Lipide abgelesen und die (isotherme)

2.5. Untersuchung von Lipidmonolagen mittels der Filmwaagenteknik

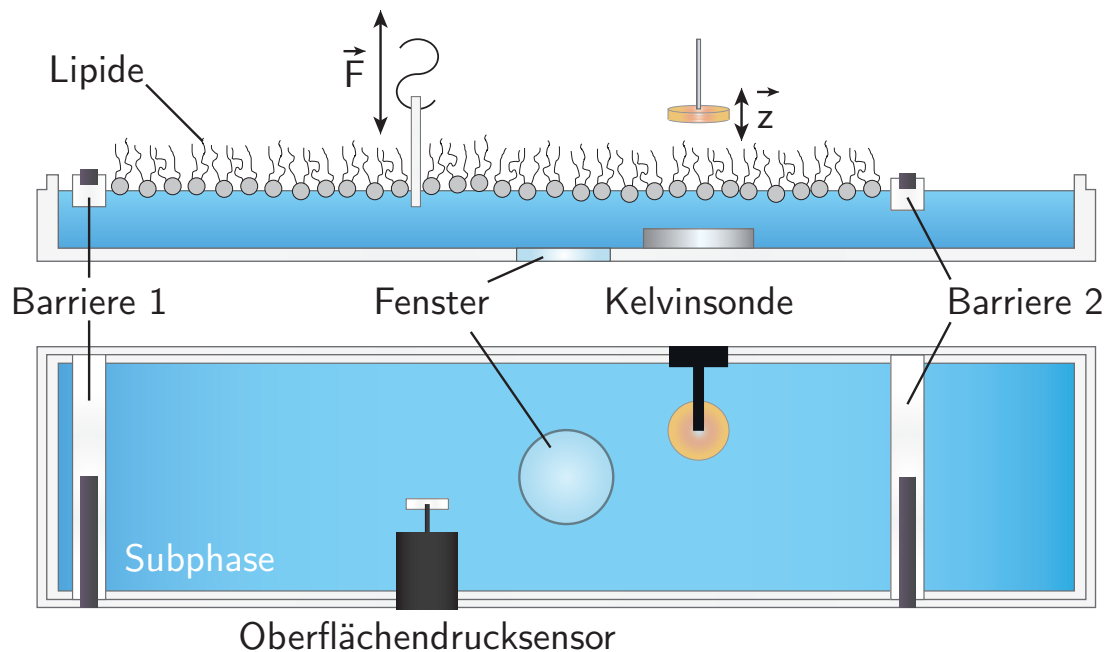


Abbildung 2.6.: Schematische Seit- und Draufsicht der verwendeten Filmwaage: Ein Teflontrog bildet die Grundstruktur der Filmwaage. Dieser wird mit einer definierten Subphase (deionisiertes Wasser, Salzlösung etc.) gefüllt und die in einem organischen Lösungsmittel gelösten Lipide auf die Oberfläche zugegeben. Diesen Vorgang nennt man „Spreiten“. Zwei unabhängig ansteuerbare Barrieren ermöglichen es, die Oberflächendichte der Lipide beliebig zu variieren. Der Oberflächendrucksensor ermittelt aus der Zugkraft \vec{F} auf das Wilhelmy-Plättchen den Lateraldruck π . Bei einer typischen Isothermen-Messung wird π als Funktion der Lipidfläche A aufgezeichnet. Gleichzeitig kann das Oberflächenpotential V^{tot} der Grenzschicht mit einer in der \vec{z} -Richtung vibrierenden Kelvinsonde gemessen werden. Deren Funktionsweise wird später noch genauer erläutert. Weiterhin ist die Filmwaage mit einem Fenster aus Quarzglas ausgestattet. Dies erlaubt die Messung kolorimetrischer Reaktionsprodukte, wie sie in den nachfolgenden Experimenten an Enzymen auftreten werden.

Kompressibilität der Grenzschicht κ_T errechnet werden (vgl. Gleichung 2.15).

2.5.2. Phasenzustände von Lipidmonolagen

Wie wir bereits in Abschnitt 2.1.2 gesehen haben, können Lipiddoppelschichten in unterschiedlichen Phasenzuständen vorliegen. Auch das Verhalten von Lipidmonolagen wird mit Phasendiagrammen beschrieben [54]. Die schematische Isotherme in Abbildung 2.7 bildet die wichtigsten Phasen von Phospholipid-Monoschichten ab:

- **Gasphase:**

Bei sehr großen Flächen befinden sich die Lipide in einem gasförmigen Zustand. Die Molekülketten orientieren sich unter einem bevorzugten Winkel zur Oberfläche. Ansonsten verhalten sich die Lipide aber völlig ungeordnet und interagieren kaum miteinander. Dadurch kann der Zustand als ideales Gas beschrieben werden.

- **Flüssig-expandierte Phase:**

Die Lipide bilden eine geschlossene Oberfläche ohne laterale Fernordnung. Wie Moleküle in einer Flüssigkeit, können die Lipide frei in der Schicht diffundieren. Die Kettenordnung wechselt ständig zwischen *gauche*- und *trans*-Konformation. Diese Phase ist vergleichbar mit der L_α -Phase von Lipiddoppelschichten (siehe Abb. 2.3) und besitzt eine moderate Kompressibilität.

- **Flüssig-kondensierte Phase:**

In dieser Phase befinden sich die Ketten in der *trans*-Konformation und sind parallel zueinander ausgerichtet. Der Neigungswinkel zur Wasseroberfläche variiert je nach Kompressionsgrad und beträgt maximal 30° . Die Diffusionskonstante der Lipide, wie auch die Kompressibilität der Grenzschicht, ist deutlich geringer als in der flüssig-expandierten Phase. Aufgrund dieser Eigenschaften wird diese Phase als Analogon zur L_β -Phase der Lipiddoppelschicht betrachtet.

- **Kristalline Phase:**

Bei noch kleineren Molekülflächen geht die flüssig-kondensierte Phase in die kristalline Phase über. Die Ketten stehen senkrecht zur Wasseroberfläche und die Kopfgruppen sind packungsdicht angeordnet. Folglich lässt sich die Grenzschicht schwer weiter komprimieren und κ_T nimmt einen sehr geringen Wert an. Wird die Oberflächendichte trotzdem weiter erhöht, kommt es zu einem Kollaps der Lipidmonolage. Dabei können Mehrfachschichten entstehen oder Vesikel abgeschnürt werden.

Zwischen den einzelnen Phasen kommt es zu Phasenübergängen, wie wir sie analog schon für die Lipiddoppelschichten beschrieben haben:

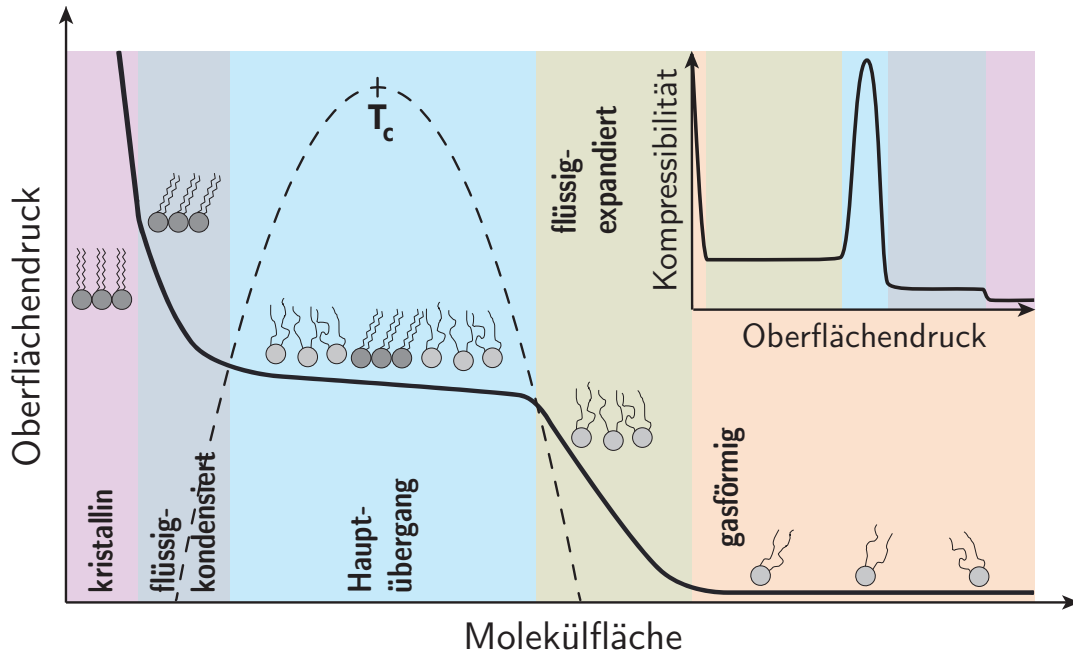


Abbildung 2.7.: Schematische Isotherme und die entsprechende Kompressibilität: Bei niedrigen Drücken sind die Lipide weit entfernt voneinander und wechselwirken kaum (Gas-Phase). Sobald die Lipide eine geschlossene Oberfläche bilden, fängt der Druck an zu steigen. Die Lipide sind in der flüssig-expandierten Phase sehr mobil und die Ketten völlig ungeordnet. Wird die Flächendichte weiter erhöht, gehen die Lipide in einem Phasenübergang erster Ordnung (Hauptübergang) in die flüssig-kondensierte Phase über. Während des Übergangs nimmt die Kompressibilität und damit die Fluktuationen in der Grenzschicht extrem zu (siehe Inset). Durch eine Temperaturerhöhung verschiebt sich das Plateau zu höheren Drücken und kleineren Flächenänderungen. Dies ist durch die gestrichelte Linie angedeutet. Bei der kritischen Temperatur T_c gehen die beiden Phasen direkt ineinander über und die Fluktuationen des Systems divergieren an diesem kritischen Punkt. In der flüssig-kondensierten Phase sind die Ketten leicht geneigt, aber parallel zueinander ausgerichtet. Erhöht man die Oberflächendichte weiter, gehen die Lipide in einem Phasenübergang zweiter Ordnung in die kristalline Phase über. Die Ketten stehen jetzt senkrecht zur Oberfläche und der Druck nimmt linear mit der Fläche zu. Die Kompressibilität der Grenzschicht ist in der flüssig-kondensierten und der kristallinen Phase sehr gering, was einer „harten“ Monolage gleichkommt.

2. Biologische Membranen

- **Phasenübergang zwischen Gas- und flüssig-expandierter Phase:**

Die gasförmige Phase geht in einem Phasenübergang erster Ordnung in die flüssig-expandierte Phase über. Daher muss eine latente Wärme ΔQ aufgewendet werden, um die Phasenumwandlung zu vollziehen. Meist liegt dieser Übergang bei so niedrigen Oberflächendrücken ($< 0,5 \text{ mN/m}$), dass er mechanisch nicht aufgelöst werden kann. Mit Hilfe des Oberflächenpotentials lässt sich dieser Übergang leichter identifizieren.

- **Hauptübergang:**

Der Hauptübergang entspricht der Umwandlung der L_α - in die L_β -Phase bei Lipiddoppelschichten. Die flüssig-expandierte Phase geht in einem Phasenübergang erster Ordnung in die flüssig-kondensierte Phase über. Dies ist an dem quasi horizontalen Verlauf der Isothermen zu erkennen. Aus Gleichung 2.15 folgt demnach, dass κ_T stark zunimmt, was gleichbedeutend mit großen Flächenfluktuationen des Systems ist. Die Monoschicht wird extrem „weich“. Die Kooperativität des Prozesses wird anhand der großen Domänen in diesem Bereich deutlich. Mit zunehmender Temperatur verschiebt sich der Phasenübergang zu höheren Drücken. Die Breite des Übergangsbereichs in der Fläche nimmt dabei näherungsweise quadratisch ab. Dies ist in Abbildung 2.7 durch die gestrichelte Parabel angedeutet. Bei einer kritischen Temperatur T_C geht die flüssig-expandierte Phase direkt in die flüssig-kondensierte Phase über. An diesem kritischen Punkt werden die Fluktuationen des Systems extrem groß. Da dieser Punkt aber experimentell schwer zu bestimmen ist, wird er meist über die sogenannte Clausius-Clapeyron-Gleichung abgeschätzt:

$$\Delta S = \frac{d\pi_c}{dT} \cdot \Delta A \quad (2.29)$$

ΔS ist die Entropiedifferenz zwischen den beiden Phasen, ΔA entspricht der Flächenänderung der Lipide während des Übergangs und π_c dem Umwandlungsdruck. Aus Gleichung 2.3 wissen wir, dass $\Delta Q = T \cdot \Delta S$. ΔQ und ΔS nehmen Richtung T_C linear ab. Deshalb kann T_C aus einer Extrapolation von $\Delta Q \rightarrow 0$ abgeschätzt werden:

$$\Delta Q = \Delta Q_0(T_C - T) \quad (2.30)$$

- **Phasenübergang zwischen flüssig-kondensierter und kristalliner Phase:**

Der Übergang von der flüssig-kondensierten hin zur kristallinen Phase ist zweiter Ordnung, was anhand des Knicks in der Isothermen zu erkennen ist. Die Oberflächendichte ändert sich in diesem Fall kontinuierlich, während die Kompressibilität einen diskontinuierlichen Sprung vollzieht.

Neben der Aufnahme des Drucksignals kann mit dem verwendeten Aufbau simultan das Oberflächenpotential V^{tot} der Grenzschicht bestimmt werden. Dafür wird eine sogenannte Kelvinsonde eingesetzt.

2.5.3. Oberflächenpotentialmessung von Lipidmonolagen

Aufgrund ihrer polaren Gruppen besitzen alle Phospholipide ein Dipolmoment μ , das größtenteils auf die finale CH_3 -Gruppe der Fettsäureketten zurückzuführen ist [55]. Demzufolge verändert eine Lipidmonolage das ursprüngliche Oberflächenpotential V_0 der Wasser-Luft-Grenzschicht um den Wert V^{CH_3} :

$$V^{CH_3} = V - V_0 \quad (2.31)$$

Sei μ_{\perp} das Dipolmoment senkrecht zur Wasseroberfläche, so ist V^{CH_3} gegeben durch:

$$V^{CH_3} = \frac{\mu_{\perp}}{\varepsilon_0 \varepsilon A} \quad (2.32)$$

Sind die Lipide negativ geladen, muss noch ein zusätzlicher Potentialsprung ψ an der Wasser-Lipid-Grenzfläche berücksichtigt werden[†]:

$$(V^{CH_3} + \psi) = \frac{\mu_{\perp}}{\varepsilon_0 \varepsilon A} \quad (2.33)$$

In der Literatur wird häufig versucht μ_{\perp} in verschiedene Bestandteile aufzutrennen. Meist wird ein separates Dipolmoment für die hydrophoben Ketten, die hydrophile Kopfgruppe und die reorientierten Wassermoleküle und Ionen in der Subphase postuliert. Jedoch hängen diese gegenseitig voneinander ab und da die Permittivität ε in den einzelnen Phasen nicht bekannt ist, ist es experimentell enorm schwierig die einzelnen Beiträge quantitativ aufzulösen. Aber auch ohne ein genaues molekulares Verständnis der Dipolmomente, können wir aus dem gemessenen Verlauf des Oberflächenpotentials wertvolle Informationen über den Zustand des Gesamtsystems erhalten, wie zum Beispiel die elektrische Kapazität der Grenzschicht oder dessen Phasenzustand.

Um die Lipid-induzierte Spannungsänderung zu messen, wird eine Kelvin-Sonde eingesetzt. Deren Name geht auf ihren Erfinder Lord Kelvin (1824–1907) zurück. Dafür befindet sich im Abstand von etwa einem Millimeter über der Lipidmonolage eine vibrierende Elektrode, die mit einer Referenzelektrode in der Subphase verbunden ist (siehe Abb. 2.6). Die Vibration führt zu einer sinoidalen Abstandsänderung $\vec{z}(t)$ der Elektroden und damit zu einer Kapazitätsänderung, die einen Strom induziert. Der Strom wird über eine externe Spannung U_{ω} , die proportional zu $V^{tot} = (V^{CH_3} + \psi)$ ist, kompensiert. Demzufolge kann das Oberflächenpotential aus der Spannung U_{ω} extrahiert werden[‡].

In Abbildung 2.8a ist eine Isothermenmessung des Lipids DMPS gezeigt. Dabei fällt sofort der parallele Verlauf des Lateraldrucks und des Oberflächenpotentials ins Auge. Mit kleiner werdenden Molekülflächen nehmen beide monoton zu. Ebenfalls deutlich sichtbar ist in bei-

[†]Dieser Beitrag wurde bereits in Abschnitt 2.4 ausführlich behandelt.

[‡]Eine genaue Herleitung dieser Zusammenhänge findet sich in [56].

2. Biologische Membranen

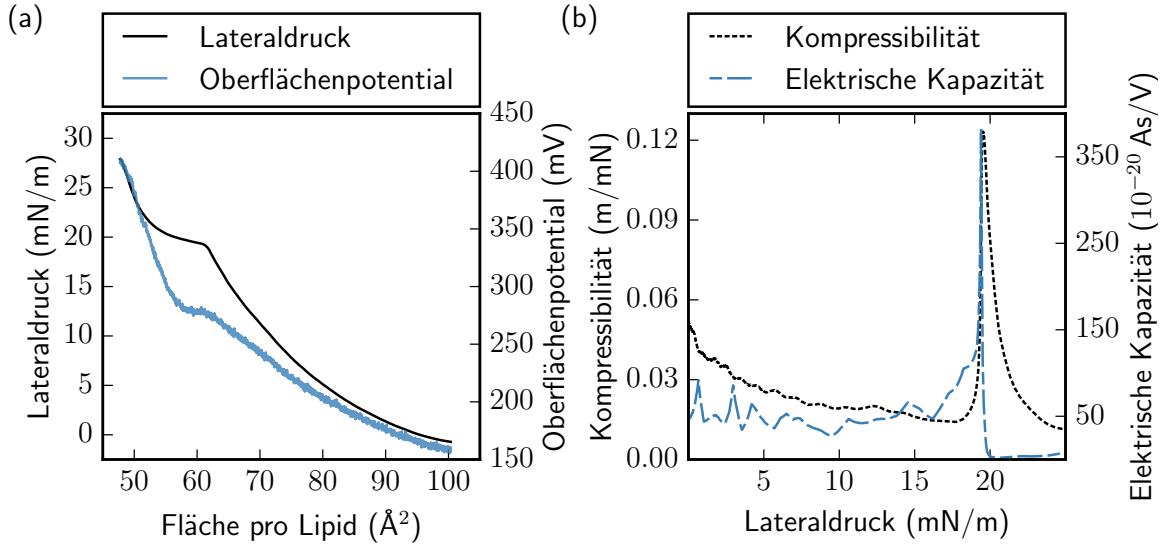


Abbildung 2.8.: Isothermenmessung von DMPS: (a) Die Änderungen des mechanischen und des elektrischen Signals verlaufen annähernd parallel zueinander. Der Phasenübergangsbereich ist jeweils eindeutig anhand der Horizontalen in den beiden Kurvenverläufen zu erkennen. Dort nehmen die Flächen- und Ladungsfluktuationen des Systems stark zu, was durch die Maxima in der isothermen Kompressibilität κ_T und der elektrischen Kapazität C_T in (b) veranschaulicht wird (pH 7,0, 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, 20°C).

den Signalen der Phasenübergang bei $A \approx 60 \text{ \AA}^2$. Aus den beiden Kurvenverläufen kann die Funktion $\psi(\pi)$ konstruiert und damit die elektrische Kapazität C_T der Monolage berechnet werden (vgl. Gleichung 2.11):

$$C_T = \left(\frac{\partial q}{\partial \psi} \right)_T = \left(\frac{\partial q}{\partial \pi} \right)_{A,T} \left(\frac{\partial \pi}{\partial \psi} \right)_{A,T} = - \left(\frac{\partial A}{\partial \psi} \right)_{q,T} \left(\frac{\partial \pi}{\partial \psi} \right)_{A,T} \quad (2.34)$$

In Abbildung 2.8b ist C_T parallel zur mechanischen Kompressibilität aufgetragen. Durch das sehr ähnliche Verhalten der beiden Messgrößen wird die bereits angesprochene Kopplung zwischen den mechanischen und elektrischen Eigenschaften des Systems noch einmal deutlich (vgl. Gleichung 2.17). Beide Suszeptibilitäten zeigen ein ausgeprägtes Maximum während des Phasenübergangs und zeugen von den enormen Flächen- und Ladungsfluktuationen in diesem Bereich. Im Gegensatz hierzu liegen die Werte von C_T im flüssig-kondensierten Bereich nur knapp oberhalb von Null. Dort ändert sich die Ladung der Grenzschicht kaum mehr und das Dipolmoment pro Molekül ist annähernd konstant.

Im nächsten Kapitel werden Enzyme als Teil einer Lipidmonolage untersucht. Dort wird sich zeigen, dass nicht nur die mechanischen und elektrischen Eigenschaften von Grenzschichten miteinander korrelieren, sondern auch die Katalyse an diese beiden Variablen koppelt.

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

Dieses Kapitel ist einer der wichtigsten Proteinklassen gewidmet – den Enzymen. Seit Jahrzehnten werden große Anstrengungen betrieben, um die Strukturaufklärung von Enzymen voranzutreiben [25, 57, 58]. Von der Struktur versucht man auf deren Funktion zu schließen (inzwischen meist unter der Zuhilfenahme von Moleküldynamiksimulationen) [59]. Nichtsdestotrotz ist die Funktionsweise von Enzymen immer noch weitgehend unverstanden [60]. Wir wollen in diesem Kapitel einen anderen Weg einschlagen: Durch Experimente an zwei verschiedenen Enzymen, die an eine Lipidmonolage gebunden sind bzw. selbst eine Monolage formen, wird gezeigt, dass die Enzymaktivität eine zustandsabhängige Größe ist. Das heißt, die Funktion der Enzyme folgt erst aus dem „richtigen“ thermodynamischen Zustand der enzymenthaltenden Grenzschicht. Dadurch wird die physikalische Phänomenologie der Grenzschicht mit den „lebendigen“ biochemischen Prozessen verknüpft. Außerdem wird dargestellt, wie dies mit dem allgegenwärtigen „Rauschen“ der Enzyme zusammenhängt.

Im Detail gehen wir dabei folgendermaßen vor: Als Erstes beginnen wir mit einer allgemeinen Einführung in die Enzymtheorie. Anschließend wird ein alternatives Modell vorgestellt und damit Folgerungen für Lipid-Enzym-Systeme abgeleitet. Im experimentellen Teil werden diese Vorhersagen überprüft und verifiziert.

3.1. Einführung in die Enzymtheorie

Das Wort *Katalyse* wurde vom dänischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius (1779–1848) eingeführt [61]. Er beobachtete, dass für verschiedene chemische Synthesen ein zusätzlicher Stoff notwendig war, der nach der Reaktion wieder unverändert vorlag. Diesem Stoff gab er den Namen *Katalysator*, abgeleitet vom altgriechischen Wort *katálysis*, was übersetzt Los- bzw. Auflösung bedeutet. Die heutige Semantik des Wortes Katalysator wurde geprägt vom deutschen Chemiker Wilhelm Ostwald. Er definierte 1894, dass ein Katalysator ein Stoff sei, der eine chemische Reaktion beschleunigt, ohne dabei selbst verbraucht zu werden und ohne das Reaktionsgleichgewicht zu verändern [62]. Seit diesem Zeitpunkt ist die industrielle Relevanz katalytischer Reaktionen enorm gestiegen. Heute werden über 90 % der Produkte der chemischen Industrie weltweit durch katalytische Reaktionen gewonnen [63].

Noch wichtiger als industrielle Katalysatoren sind für unser eigenes Leben ihre biologi-

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

schen Pendants, die sogenannten Enzyme. Ohne sie wäre kein Leben auf dieser Erde möglich. Viele Reaktionen, die in unserem Körper bereits bei 37 °C ablaufen, benötigten ansonsten hunderte Grad Celsius. Enzyme sind bis auf einige wenige Ausnahmen Proteine und bestehen daher ebenfalls aus Aminosäuren. Seit es Eduard Buchner 1897 zum ersten Mal gelang ein Enzym aus Zellen herauszulösen [64], ist unser Wissen über deren Aufbau und Funktionsweise immens angewachsen. Dieser Fortschritt beruht zu großen Teilen auf immer diffizileren Untersuchungsmethoden. Heute können selbst Einzelmoleküle während der Katalyse spektroskopisch studiert und ihre Bewegungen sichtbar gemacht werden [65]. Gleichwohl gibt es derzeit aber noch kein physikalisches Modell, durch welches sich dieses Phänomen befriedigend erklären bzw. vorhersagen ließe. So ist beispielsweise noch ungeklärt, warum chemische und physikalische Parameter wie Temperatur, Druck und pH-Wert die katalytische Rate stark zu verändern vermögen. Das folgende Zitat aus einem 2009 erschienenen Review-Artikel beschreibt diese Ambivalenz sehr treffend [60]:

“Despite the fact that the number of publications associated with the keyword ‘enzyme’ increases every year, the precise origin of enzyme catalysis has remained unsolved.”

Bisher wird die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Enzyme mit einem Absenken der für die Reaktion notwendigen Aktivierungsenergie erklärt (siehe Abb. 3.1). Das heißt, die Enzyme vermindern die Energie des energetisch ungünstigen Übergangszustands, was die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion deutlich erhöht. Der empirische Arrhenius-Ansatz beschreibt die Abhängigkeit der katalytischen Rate k von der Temperatur T und der Aktivierungsenergie E_A :

$$k = A \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{k_B T}\right) \quad (3.1)$$

Dabei stellt A einen Frequenzfaktor dar, der mit komplexeren theoretischen Modellen genauer bestimmt werden kann [66, 67]. Überraschenderweise bleibt der Exponentialterm aber auch in den ausgefeilteren Modellen erhalten. Dieser zweite Faktor erinnert sofort an die Wahrscheinlichkeitsverteilung von Gleichung 2.6 und damit an die unvermeidlichen Fluktuationen des Systems. Bei genauer Betrachtung sind die (Energie-)Fluktuationen existenziell für das Arrhenius-Modell. Ohne sie würde das System in seinem energetischen Grundzustand verharren und nie über die Energiebarriere hinaus kommen.

Die Aktivierungsenergie suggeriert ein vollständiges Verständnis der Katalyse. Dies ist aber nicht der Fall und der Ursprung von E_A selbst bleibt mysteriös [60]. Bei den meisten membrangebundenen Enzymen ist E_A nicht konstant, sondern zeigt einen Sprung, der häufig mit der Phasenübergangstemperatur der jeweiligen Membran korreliert. Beispiele hierfür sind die Enzyme Acetylcholinesterase, Phospholipase A₂, Phospholipase C und die (Na⁺, K⁺)-ATPase [68, 69, 43]. Besonders ausgeprägt ist dieses Verhalten für Lipid-Enzym-Systeme, die aus nur einer Lipid- bzw. Enzymsorte bestehen [4, 70]. In der Literatur wird dieser Effekt mit

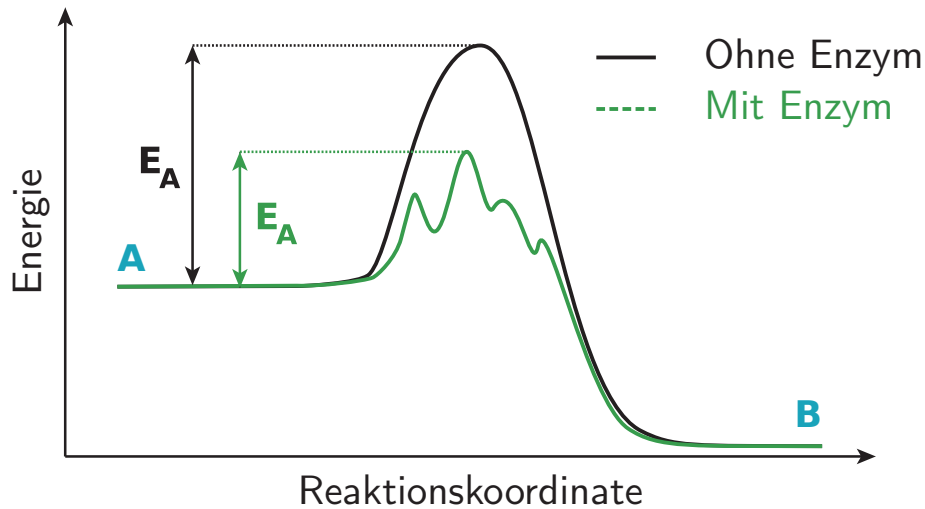


Abbildung 3.1.: Energieschema einer chemischen Reaktion: Um das Substrat A in das Produkt B umzuwandeln ist eine Aktivierungsenergie E_A notwendig. Diese energetische Hürde wird durch die Anwesenheit von Enzymen abgesenkt, was zu einer größeren Übergangswahrscheinlichkeit und damit höheren katalytischen Raten führt. Dabei durchläuft der Enzym-Substrat-Komplex häufig verschiedene Konformationen, welche sich als ein „Energiegebirge“ im Reaktionsverlauf äußern.

einer Konformationsänderung der Enzyme begründet, die durch die Phasenumwandlung der Lipide getrieben ist [71].

In natürlichen Membranen weisen Enzyme ebenfalls oft eine abrupte Änderung von E_A auf. Die Temperatur der Diskontinuität in E_A kann aber für verschiedene Enzyme in der selben Membran unterschiedlich sein. Dies wird meist auf die lokale Umgebung der Enzyme und damit die laterale Strukturierung der Membran zurückgeführt (Stichwort „Mikrodomänen“). Überraschenderweise wird der Sprung von E_A bei Tieren, die Winterschlaf halten und deren Körpertemperatur dabei signifikant absinkt, nicht oder erst bei sehr niedrigen Temperaturen beobachtet [72, 73, 74]. In diesen Tieren besteht die Membran aus vielen kurzkettigen und ungesättigten Lipiden, was eine Fluide-Phase bis hin zu tiefen Temperaturen ermöglicht.

Die Aktivität von Enzymen hängt maßgeblich vom Zustand der Grenzschicht ab. Neben den zahlreichen Untersuchungen von E_A verschiedener Enzyme in der Fluiden- bzw. in der Gel-Phase von Membranen, gibt es noch einige wenige Arbeiten, die sich mit der Aktivität von Enzymen im Phasenübergang selbst befassen. Experimente mit den lipidabbauenden Phospholipasen zeigen, dass deren Aktivität maximal wird im Phasenübergang der Membran (siehe Abbildung 3.2) [75, 76, 77, 78]. Die Korrelation von Aktivitätsmaximum und Phasenübergang konnte ich während meiner Diplomarbeit für das Enzym Acetylcholinesterase bestätigen [34]. Daher stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um ein allgemeines Phänomen

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

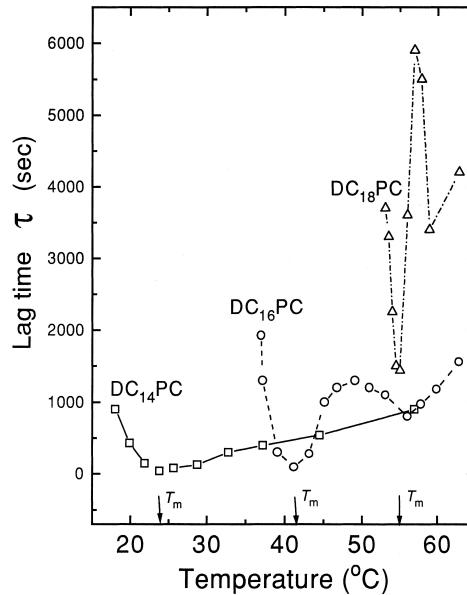


Abbildung 3.2.: Einfluss des Phasenzustands der Membran auf die Aktivität der Phospholipase A₂: Die Latenzzeit τ des Enzyms variiert je nach Temperatur und verwendeter Lipidumgebung (Phosphatidylcholin-Doppelschicht). Im Phasenübergang der Lipide (T_m) nimmt τ ein Minimum an, gleichbedeutend mit einem Maximum in der katalytischen Rate k ($\tau \sim k^{-1}$) (aus [76]).

handelt, oder die Beobachtungen nur spezifische Einzelfälle darstellen. Interessanterweise werden nicht nur Enzyme durch den Phasenzustand beeinflusst, sondern auch andere Funktionen der Membran, wie beispielsweise Transportprozesse oder die Permeabilität [79, 80, 81, 82]. Im weiteren Verlauf wollen wir zeigen, dass eine entropische Beschreibung der zweidimensionalen Grenzschicht sowohl die unterschiedliche Aktivierungsenergie in den beiden Phasenzuständen der Membran als auch das Aktivitätsmaximum im Phasenübergang erklären kann.

3.2. Theoretisches Modell von Konrad Kaufmann

Im Jahr 1998 stellte Konrad Kaufmann ein alternatives Modell für die Enzymkatalyse auf, das nicht auf einer energetischen Systembeschreibung basiert, sondern die Entropie der Grenzschicht in den Mittelpunkt rückt. Das folgende Kapitel beruht größtenteils auf gemeinsamen Gesprächen und repräsentiert daher nur das Verständnis des Autors davon. Für eine umfassende Beschreibung der Theorie empfehlen wir seine öffentlichen Arbeiten [83] bzw. ihn direkt zu konsultieren.

Kaufmanns Ansatz beginnt damit, den zweiten Hauptsatz in der Einstein'schen Entropiepotential-Formulierung [36] (vgl. Gleichung 2.6) auf das „richtige“ System anzuwenden. Das richtige System ist in diesem Fall die zweidimensionale wässrige Grenzfläche des Enzym-Substrat-Komplexes. Durch die Bindung des Substrats an das Enzym wird es Teil der Grenz-

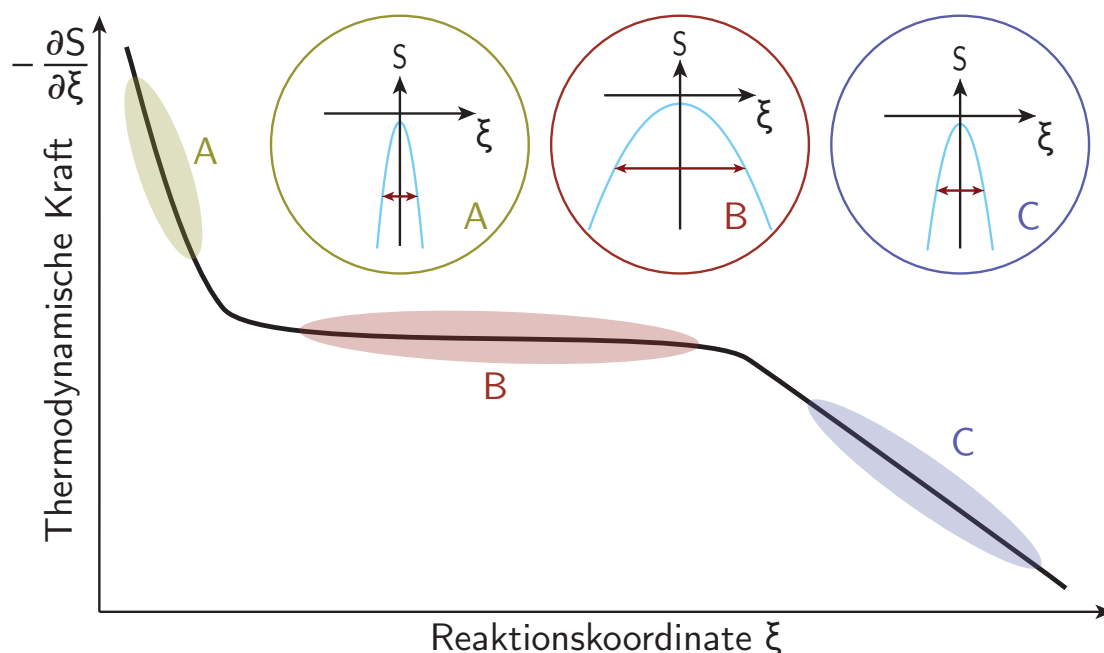


Abbildung 3.3.: Hypothetisches Zustandsdiagramm einer Enzym-Molekül-Verbindung: Induziert die Adsorption eines Moleküls an das Enzym einen kritischen Zustand in der Grenzfläche (Fall B), kommt es zu starken Fluktuationen der Reaktionskoordinate ξ . Dies ist auf ein sehr weites Entropiepotential und damit eine sehr breite Wahrscheinlichkeitsverteilung der möglichen Enzym-Molekül-Mikrozustände zurückzuführen. In der Katalyseterminologie nennt man das Molekül dann „Substrat“. Treten durch die Adsorption aber nur sehr geringe Fluktuationen auf (Fall A), so entsteht eine langfristige Bindung zwischen Molekül und Enzym. Das Molekül wird folglich als „Inhibitor“ bezeichnet. Der Fall C führt dagegen meist nur zu einer kurzen Molekülbindung bzw. sehr selten zu einer katalytischen Reaktion.

schicht und das System wird fortan durch ein (neues) gemeinsames Entropiepotential beschrieben. Zur Katalyse kommt es aber nur, wenn durch die Bindung große Fluktuationen in der Reaktionskoordinate ξ induziert werden, d. h. das systembeschreibende Entropiepotential sehr weit wird. Dies entspricht dem Fall B in Abbildung 3.3. Fallen dagegen die Fluktuationen in der Grenzfläche sehr gering aus, kann es zu einer langfristigen Bindung des Substrats kommen (siehe Fall A in Abbildung 3.3). In der Katalyseterminologie spricht man dann von einem Inhibitor. Durch die feste Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum ist das Enzym katalytisch nicht mehr aktiv. Bindung und Katalyse sind demnach zwei Extreme ein und desselben Bildes. Der Zustand der Grenzschicht spielt in Kaufmanns Modell die zentrale Rolle und nicht etwa spezifische Konformationsänderungen. Diese sind vielmehr als Folge einer Zustandsänderung durch die Adsorption des Substratmoleküls zu sehen, die im Allgemeinen eine Änderung **aller** thermodynamischer Variablen bedingt.

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

Der vorherige Abschnitt ist für das Verständnis der Experimente unabdingbar. Deshalb werden die wichtigsten Aussagen noch einmal dargelegt: Durch die Bindung eines Moleküls an ein Enzym entsteht ein neuer Grenzflächenzustand, der durch ein gemeinsames Entropiepotential beschrieben wird. Die Reaktionskoordinate ξ ist nunmehr eine Variable der Entropie ($S(n_i) = S(A, E, \xi \dots)$). Dadurch ist auch die Wahrscheinlichkeitsverteilung der möglichen Mikrozustände von ξ vollständig vorgegeben. Induziert die Adsorption des Moleküls ein breites Entropiepotential, kommt es zu großen Fluktuationen in den Variablen. Das Molekül wird dann als „Substrat“ bezeichnet und fluktuiert ständig zwischen Substrat- und Produktzustand hin und her. Führt die Adsorption des Moleküls hingegen zu einem sehr schmalen Entropiepotential der Grenzschicht, kommt es zu einer langfristigen Bindung und das Molekül wird „Inhibitor“ genannt. Die Frage ist nun: Wie führen die Fluktuationen von ξ schlussendlich zu den messbaren Raten im Bulk?

3.2.1. Zusammenhang zwischen Raten und Fluktuationen

Kaufmann leitet einen Zusammenhang zwischen den Raten und den Fluktuationen ab, indem er Einsteins Vorgehen in seiner Publikation zur Brown'schen Molekularbewegung folgt [84]. Einstein untersucht darin, wie sich die Position von Teilchen über ein kleines Zeitintervall τ entwickelt. Die Koordinaten der Teilchen verändern sich hierbei um einen Wert Δ , für dessen Verteilung ein Häufigkeitsgesetz $\varphi(\Delta)$ gilt. Diese Aussage lässt sich identisch auf die Reaktionskoordinate übertragen. Dementsprechend folgt für die Anzahl der Teilchen, die sich zum Zeitpunkt $t + \tau$ zwischen ξ und $\xi + d\xi$ in der Oberflächeneinheit x befinden:

$$f(x, \xi, t + \tau) d\xi = d\xi \int_{\Delta=-\infty}^{\Delta=+\infty} f(x, \xi + \Delta) \varphi(\Delta) d\Delta \quad (3.2)$$

Da τ sehr klein ist gilt:

$$f(x, \xi, t + \tau) = f(x, \xi, t) + \tau \frac{\partial f}{\partial t} \quad (3.3)$$

Des Weiteren kann $f(x, \xi + \Delta, t)$ nach Potenzen von Δ entwickelt werden:

$$f(x, \xi + \Delta, t) = f(x, \xi, t) + \Delta \frac{\partial f(x, \xi, t)}{\partial \xi} + \frac{\Delta^2}{2} \frac{\partial^2 f(x, \xi, t)}{\partial \xi^2} + \dots \quad (3.4)$$

Anschließend wird die Entwicklung vor das Integral gezogen, da nur sehr kleine Werte von Δ etwas zum Integral beitragen. Aus Gleichung 3.2 wird dann:

$$f + \frac{\partial f}{\partial t} \tau = f \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi(\Delta) d\Delta + \frac{\partial f}{\partial \xi} \int_{-\infty}^{+\infty} \Delta \cdot \varphi(\Delta) d\Delta + \frac{\partial^2 f}{\partial \xi^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\Delta^2}{2} \cdot \varphi(\Delta) d\Delta + \dots \quad (3.5)$$

3.2. Theoretisches Modell von Konrad Kaufmann

Da das Integral über die Häufigkeitsverteilung insgesamt eins ergeben muss, kürzen sich die jeweils ersten Terme auf beiden Seiten der Gleichung weg ($f \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi(\Delta) d\Delta = f$). Darüber hinaus verschwinden auf der rechten Seite im Gleichgewicht die Terme zwei, vier etc. da $\varphi(\Delta) = \varphi(-\Delta)$. Außerhalb des Gleichgewichts führt dies dazu, dass entweder die Hin- oder die Rückreaktion überwiegt. Zusätzlich wird die Reaktionsrate k definiert als:

$$k = \frac{1}{\tau} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\Delta^2}{2} \varphi(\Delta) d\Delta \quad (3.6)$$

Schlussendlich folgt daraus die wohlbekannte (Diffusions-)Gleichung:

$$\frac{\partial f}{\partial t} = k \frac{\partial^2 f}{\partial \xi^2} \quad (3.7)$$

Im Fall der Diffusion ergibt sich daraus für die mittleren quadratischen Ortsschwankungen der Teilchen:

$$\langle (\delta x)^2 \rangle \propto Dt \quad (3.8)$$

Analog gilt demnach für den Zusammenhang zwischen den mittleren quadratischen Schwankungen der Reaktionskoordinate ξ und der Rate k :

$$\langle (\delta \xi)^2 \rangle \propto kt \quad (3.9)$$

Die identische Beschreibung von Diffusion und Katalyse ermöglicht eine einheitliche Interpretation der beiden Prozesse. Geben wir beispielsweise einen Tropfen Farbstoff in ein Wassergefäß, wird sich der Farbstoff mehr und mehr verteilen, bis eine homogene Lösung entstanden ist. Anfangs befindet sich das System in einem sehr unwahrscheinlichen Zustand und entwickelt sich in der Folge in Richtung wahrscheinlicherer Zustände, d. h. in Richtung Homogenität der Lösung. Die Geschwindigkeit des Prozesses wird dabei durch die reversiblen Ortsfluktuationen der Farbstoffmoleküle und damit deren Diffusionskonstanten bestimmt. Erhitzen wir die Flüssigkeit quasi-statisch, wird das „Gleichgewicht“ durch die größeren Fluktuationen deutlich schneller erreicht.

Der Katalyseprozess kann ganz analog interpretiert werden: Zu Beginn präparieren wir durch die Zugabe des Substrats (Reaktionsedukt) einen sehr unwahrscheinlichen Zustand. In der Folge entsteht immer mehr Produkt, bis das Reaktionsgleichgewicht, ergo ein deutlich wahrscheinlicher Zustand, erreicht ist. Im Gleichgewicht heben sich Abbau und Synthese des Substrats auf. Diese Prozesse laufen auch vollständig ohne Enzym ab, jedoch meist nur extrem langsam. Das Enzym übernimmt die Rolle, welche die Temperaturerhöhung im Diffusionsfall spielt. Es erhöht die Fluktuationen der Reaktionskoordinate, was zeitlich betrachtet, zu deutlich größeren katalytischen Raten führt (vgl. Gleichung 3.9). In beiden Fällen sind die Fluktuationen vollständig reversibel. Daraus folgt, dass die Irreversibilität der Prozesse laut

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

Einstein nur eine „scheinbare“ ist [36]:

„Wir haben nach Boltzmann die scheinbare Nichtumkehrbarkeit [einer chemischen Reaktion] darauf zurückzuführen, daß die Zustände von verschiedener Wahrscheinlichkeit sind, und daß das System wahrscheinlich Zustände größerer Wahrscheinlichkeit annimmt, wenn es sich gerade in einem Zustande relativ geringer Wahrscheinlichkeit befindet.“

Die Wahrscheinlichkeit des Anfangszustands ist so gering, dass dieser in einer endlichen Zeitspanne praktisch nie mehr beobachtet wird.

3.2.2. Korrelation von Spezifität und Aktivität

Die entropische Betrachtungsweise der Katalyse führt noch zu einer weiteren wichtigen Schlussfolgerung. So lässt sich damit das Paradox auflösen, dass eine hohe Substratspezifität mit hohen Abbauraten einhergeht. Die allermeisten Stoffe, die an das Enzym binden, induzieren keine starken Fluktuationen in der Grenzfläche. Nur einige sehr wenige Substanzen verschieben das System in einen stark fluktuierenden Zustand. Berücksichtigt man mehr als eine thermodynamische Variable, erhöht sich die „Spezifität dieses Zustands“ weiter. Demzufolge beruht dieses Paradoxon auf der Spezifität des induzierten Zustands. Durch eine geeignete Wahl der thermodynamischen Variablen (pH, Salzkonzentration, Temperatur, Druck ...) lassen sich die Fluktuationen des Systems und somit auch die katalytischen Raten optimieren (vgl. Gleichung 3.9). Dieser Effekt ist beispielsweise durch das pH-Maximum eines jeden Enzyms wohl bekannt. Im Grenzfall gehen die Fluktuationen gegen unendlich, was auch als kritischer Zustand bezeichnet wird. Die Katalyse wird in diesem Fall „optimal“ und ist nur durch die Diffusion begrenzt.

3.2.3. Enzyme als Teil einer Grenzschicht

Bisher haben wir den Fall eines isolierten Enzym-Substrat-Komplexes betrachtet. Prinzipiell lassen sich diese Erkenntnisse aber leicht auf komplexere Systeme, in denen Enzyme Teil einer größeren Grenzschicht sind, verallgemeinern. Da jeder Grenzschicht ein eigenes Entropiepotential zukommt (vgl. Abschnitt 2.3), kann man davon ausgehen, dass die Eigenschaften der verschiedenen Konstituenten der Schicht miteinander gekoppelt sind. Kaufmanns Theorie kann also ohne weiteres auch zur Beschreibung von natürlichen Membranen verwendet werden. Im nächsten Abschnitt wollen wir exemplarisch anhand von nur einer Variablen das zu erwartende Verhalten von Enzymen in einer Lipidgrenzschicht ableiten. Es muss jedoch angemerkt werden, dass es sich dabei um einen Spezialfall der Kaufmann'schen Theorie handelt und keinen Beitrag darstellt, der über die ursprüngliche Theorie hinausgeht. Nichtsdestotrotz lassen sich damit einige interessante phänomenologischen Ergebnisse erklären.

Als Teil einer Lipidmembran sind die Fluktuationen von Enzymen nicht komplett unabhängig von ihrer lokalen Umgebung. Vielmehr werden sie durch das Gesamtsystem beeinflusst. Normalerweise charakterisiert man Katalysatoren anhand ihrer Aktivierungsenergie E_A . Deshalb wollen wir den Einfluss der Grenzschichtfluktuationen auf diese Observable untersuchen. Im Fall eines Enzym-Lipid-Systems wird das Entropiepotential folglich durch die Energie der Enzyme E_E und zweitens die Energie der Lipide E_L . Die Taylor-Entwicklung der Entropie um die Gleichgewichtsenergiewerte E_L^0 und E_E^0 nimmt daher die folgende Form an (vgl. Gleichung 2.4):

$$S(E_E, E_L)_{E_E^0, E_L^0} = \frac{1}{2} \frac{\partial^2 S}{\partial E_L^2} \delta E_L^2 + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 S}{\partial E_E^2} \delta E_E^2 + \frac{\partial^2 S}{\partial E_E \partial E_L} \delta E_E \delta E_L \quad (3.10)$$

Der erste Term ergibt sich mit Gleichung 2.12 zu:

$$\frac{1}{2} \frac{\partial^2 S}{\partial E_L^2} \delta E_L^2 = -\frac{1}{2} \frac{1}{T^2 c_L} \delta E_L^2 \quad (3.11)$$

c_L steht dabei für die Wärmekapazität der Lipidgrenzschicht. Der zweite Term kann völlig analog mit einer eigenen Wärmekapazität c_E für das Enzym-Untersystem beschrieben werden:

$$\frac{1}{2} \frac{\partial^2 S}{\partial E_E^2} \delta E_E^2 = -\frac{1}{2} \frac{1}{T^2 c_E} \delta E_E^2 \quad (3.12)$$

Mit der Energievariation des Enzyms $\delta E_E = \delta(E_E^0 + E_A) = \delta E_A$ kann der dritte Term ebenfalls weiter vereinfacht werden:

$$\frac{\partial^2 S}{\partial E_E \partial E_L} \delta E_E \delta E_L = \frac{\partial}{\partial E_A} \left(\frac{1}{T} \right) \delta E_A \delta E_L = -\frac{1}{T^2} \left(\frac{\partial T}{\partial E_A} \right) \delta E_A \delta E_L \quad (3.13)$$

Dementsprechend folgt für das Entropiepotential des Gesamtsystems:

$$S(E_E, E_L)_{E_E^0, E_L^0} = -\frac{1}{2T^2} \left(\frac{1}{c_L} \delta E_L^2 + \frac{1}{c_E} \delta E_E^2 + 2 \left(\frac{\partial T}{\partial E_A} \right) \delta E_L \delta E_A \right) = \quad (3.14)$$

$$= -k_B \left(\frac{\delta E_L^2}{\langle (\delta E_L)^2 \rangle} + \frac{\delta E_E^2}{\langle (\delta E_E)^2 \rangle} + 2 \frac{\delta E_L \delta E_E}{\langle (\delta E_L \delta E_E) \rangle} \right) \quad (3.15)$$

Die ersten beiden Terme des Entropiepotentials der Grenzschicht sind unabhängig voneinander und beschreiben die beiden Untersysteme Enzyme und Lipide separat. Der dritte Term wiederum bildet die Kopplung der Fluktuationen der beiden Systeme ab. Phänomenologisch können eindeutige Aussagen über den Zusammenhang zwischen dem ersten und dritten Term gezogen werden. Wie in der Einführung angesprochen, zeigen unzählige membrangebundene Enzyme einen Knick in ihrer Aktivierungsenergie während der Phasenumwandlung der umgebenden Membran [68, 69, 43, 4, 70]. Bezogen auf Gleichung 3.14 bedeutet dies einerseits,

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

dass die gemessene Wärmekapazität c_L der Lipide maximal wird (gleichbedeutend mit großen Energiefluktuationen). Andererseits demonstriert die Diskontinuität von E_A , dass $\left(\frac{\partial E_A}{\partial T}\right)$ bei der selben Temperatur ein Maximum durchläuft und somit der Kopplungsterm maximiert wird. Da der Phasenübergang zu maximalen Fluktuationen $\langle(\delta E_L)^2\rangle$ und $\langle(\delta E_L \delta E_E)\rangle$ führt, müssen ebenfalls die Energiefluktuationen des Enzyms $\langle(\delta E_E)^2\rangle$ und damit auch die Fluktuationen der Aktivierungsenergie $\langle(\delta E_A)^2\rangle$ maximal werden. Nach Gleichungen 3.1 und 3.9 sollte dies zu einer Erhöhung der katalytischen Rate führen, wie bereits für die Enzyme Phospholipase A₂ und Acetylcholinesterase experimentell beobachtet [75, 85, 34]. In der Gel- bzw. Fluiden-Phase ist die Wärmekapazität der Lipide dagegen annähernd konstant. Daher erklärt sich auch die konstante, aber verschieden große Aktivierungsenergie in diesen beiden Phasen. Wie stark die Aktivität der membrangebundenen Enzyme vom Zustand der Lipide beeinflusst wird, unterscheidet sich aber mit Sicherheit für jedes System deutlich. Ist der Kopplungsterm klein und die Systeme damit praktisch unabhängig voneinander, wird man experimentell kaum einen Effekt auf die Aktivierungsenergie nachweisen können.

Die bisherige Betrachtungsweise lässt sich natürlich auch umkehren. Die Lipide beeinflussen die Eigenschaften der Enzyme, doch ist dieser Effekt selbstverständlich wechselseitiger Natur. Durch die temperaturabhängige Messung von E_A können wir zugleich darauf schließen, welchen Einfluss die Enzyme auf den lokalen Zustand der Lipide haben. Wie bereits erwähnt, stimmt die Temperatur, bei der der Knick in der Aktivierungsenergie des Enzyms auftritt, nicht immer zu 100 % mit der Phasenumwandlungstemperatur der reinen Lipidschicht überein. Dies erklärt sich leicht mit der Enzym-induzierten lokalen Zustandsänderung. Was zu einer Änderung in der Aktivierungsenergie führt, bewirkt gleichzeitig eine lokale Verschiebung der Phasenübergangstemperatur. Somit kann die Phänomenologie der Aktivierungsenergie dafür verwendet werden den „tatsächlichen“ Phasenübergang der Enzym-Lipid-Mikrodomäne zu bestimmen.

Durch diese Erkenntnisse können auch Aussagen über reale Systeme, wie beispielsweise natürliche Membranen, getroffen werden. Die auftretende Phasenseparation und Strukturierung der Membran führt dazu, dass das Gesamtsystem als ein Ensemble von vielen Untersystemen angesehen werden kann. Jedes Untersystem besitzt ein eigenes Entropiepotential, ist jedoch über die „Kopplungsterme“ an das Gesamtsystem angeschlossen. Je nach Stärke der Kopplung werden die Untersysteme somit sehr unterschiedlich auf Änderungen des Gesamtsystems bzw. anderer Untersysteme reagieren.

Die Bevorzugung der Energie als Observable zur Beschreibung eines Enzym-Lipid-Systems ist natürlich rein willkürlicher Natur. Die gesamte Ableitung lässt sich entsprechend für jede beliebige Variable vollziehen. Da letzten Endes aber die Fluktuationen des Enzym-Substrat-Komplexes und folglich die Fluktuationen der Reaktionskoordinate ξ die Rate bestimmen, sind die entscheidenden Fragen, ob und wie diese von der Lipidumgebung abhängen. Die bisher diskutierten (Vesikel-)Experimente aus der Literatur deuten daraufhin, dass die Fluk-

3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen

tuationen von ξ tatsächlich substanziell von den Lipiden abhängen. Über das Wie lassen sie jedoch keine eindeutige Aussage zu. Um diesem Punkt experimentell nachzugehen und die Vorhersagen der Theorie von Kaufmann zu überprüfen, müssen wir daher auf eine andere Methode zurückgreifen, die die simultane Bestimmung von Aktivität und Zustand erlaubt.

Die Filmwaage stellt hierfür das optimale Werkzeug dar. Sie erlaubt es, die katalytische Rate k in Abhängigkeit des Grenzflächenzustands zu messen. Daher wollen wir der hier aufgeworfenen Frage im nächsten Abschnitt mit Experimenten an zwei verschiedenen Enzymen nachgehen. Dabei folgen wir dem Aufbau des Theorieteils. D.h. zuerst betrachten wir ein reines Enzymsystem, bevor wir anschließend Enzyme als Teil einer Lipidschicht untersuchen.

3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen

Um die Zustandsabhängigkeit von Enzymen zu testen, greifen wir auf zwei in der Forschung sehr häufig anzutreffende Enzyme zurück: die Meerrettichperoxidase und die Katalase.

3.3.1. Vorstellung der Katalase

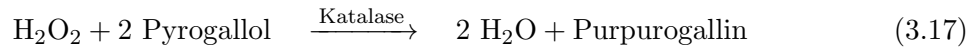
Die Katalase gehört zu der Enzymgruppe der Hydroperoxidasen. Ihr Vorkommen erstreckt sich über praktisch alle Lebewesen, wo sie durch den Abbau von Wasserstoffperoxid eine wichtige Schutzwirkung vor oxidativen Schäden einnimmt [86]. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür sind graue Haare. Im Alter nimmt die Katalase-Konzentration in den Haarfollikeln ab. Das führt dazu, dass das entstehende Wasserstoffperoxid nicht mehr komplett abgebaut wird und es somit die Haare nach und nach ausbleicht [87]. Die katalysierte Reaktion des Enzyms lautet:



Die katalytische Rate der Katalase zählt zu den schnellsten Enzymkatalysen überhaupt. Ein einzelnes Enzym ist in der Lage unglaubliche $4 \cdot 10^7$ Wasserstoffperoxidmoleküle pro Sekunde abzubauen [66]. Die katalytische Effizienz ist so hoch, dass selbst die Diffusion des Substrats bzw. des entstehenden Produkts limitierend auf die Reaktionsgeschwindigkeit wirken können. In diesem Fall spricht man von „katalytischer Perfektion“, was in der Natur äußerst selten auftritt [66]. Die von uns verwendete Form der Katalase stammt von *Sigma-Aldrich* und wird aus der Schweineleber extrahiert. Sie besteht aus vier identischen Untereinheiten. Das Molekulargewicht beträgt insgesamt 240 kDa. Das aktive Zentrum der Untereinheiten wird von einer Häm-Gruppe, d.h. einer Komplexverbindung mit Fe(III) als Zentralion, gebildet. Momentan geht man davon aus, dass das Eisenatom zunächst durch das Wasserstoffperoxid zu Fe(IV) oxidiert und durch das zweite an der Reaktion beteiligte Wasserstoffperoxidmolekül unter Abgabe von Wasser zurück in den Grundzustand reduziert wird [86]. Das aktive Zen-

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

trum besteht außer dem Eisen-Ion noch aus einem Histidin- und Asparagin-Aminosäurerest [88]. Neben dem Abbau von reinem Wasserstoffperoxid, besitzt das Enzym die Fähigkeit viele weitere Moleküle zu oxidieren. Dies machen wir uns zu Nutze und verwenden zum Nachweis der Katalase-Aktivität die Umwandlung des farblosen Pyrogallols in das orange-braune Purpurogallin:



Die Bildung des Endprodukts lässt sich leicht anhand der Absorption von Purpurogallin bei einer Wellenlänge von etwa 420 nm verfolgen [89, 90]. Am besten funktioniert dies bei einem pH-Wert von 6,9, da hier die Autooxidation des Substrats sehr gering und das Verhältnis zwischen direktem Abbau von Wasserstoffperoxid und Abbau von Pyrogallol klein ist [89]. Deshalb werden die nachfolgenden Katalase-Experimente alle bei diesem pH-Wert durchgeführt.

Neben der hohen Rate zeichnet sich die Katalase vor allem durch ihre extreme Stabilität aus. Selbst das Erhitzen auf bis zu 60 °C kann ihrer Funktion kaum etwas anhaben [86]. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Enzyme auf Wasser ebenfalls eine enorm stabile Monolage bilden [91]. Davon werden wir im weiteren Verlauf für die Aktivitätsversuche Gebrauch machen.

3.3.2. Voruntersuchungen zur Katalase

Zur Untersuchung reiner Enzymmonolagen wird die kristalline Form der Katalase in einem ersten Schritt in PBS-Puffer gelöst (aus dem engl. für *phosphate buffered saline*). Die Salzlösung enthält 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Phosphatpuffer bei einem pH von 7,4. Die Endkonzentration der Enzyme wird auf 10 mg/ml eingestellt. Durch das langsame zutitrieren von 7,5 µl Enzymlösung auf die Wasseroberfläche der Filmwaage (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,9, Fläche 300 cm²) bildet sich nach und nach eine geschlossene Enzymmonolage. Nach circa einer Stunde kann kein weiterer Druckanstieg festgestellt werden und das System geht ins Gleichgewicht über [91]. Nun lässt sich das isotherme Verhalten der Enzyme untersuchen. Abbildung 3.4 zeigt typische Flächen-Druck-Kurven der Katalasemonolage, die mit einer Kompressions- bzw. Expansionsgeschwindigkeit von 5 cm²/min (das korrespondiert mit $\approx 225 \text{ Å}^2/\text{min}$ pro Enzym) aufgenommen wurde. Überraschenderweise zeigt die Katalase ein den Lipiden sehr ähnliches Verhalten. Bei der Kompression von 11 700 auf 3100 Å² steigt der Lateraldruck monoton von 12,8 auf 32,0 mN/m an. Die Steigung der Isothermen nimmt aber zunächst leicht ab, bevor sie in der Nähe des Druckmaximums wiederum deutlich zunimmt. Während der Expansion ist dieses Verhalten noch stärker ausgeprägt. Zuerst fällt der Druck steil ab, bevor die Isotherme einen fast horizontalen Verlauf nimmt. Dies deutet auf eine extrem weiche Grenzschicht hin und impliziert damit große Flächenfluktuationen des Proteins.

3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen

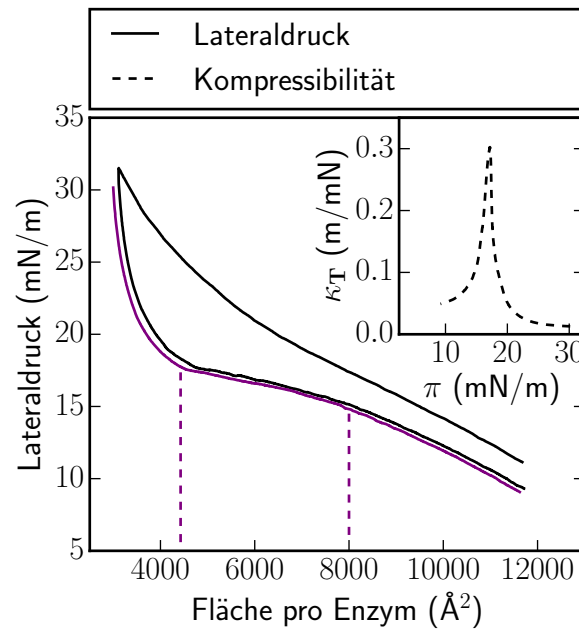


Abbildung 3.4.: Typische Isothermen einer Katalasemonolage: Besonders in den Expansionskurven ist ein dreiphasiges Verhalten, das sehr an Lipide erinnert, erkennbar. Der Übergangsbereich korrespondiert vermutlich mit einer Konformationsumwandlung des Enzyms und zeigt eine deutlich erhöhte Kompressibilität (siehe Inset). Durch die Integration des Umwandlungsbereichs, dessen Grenzen mit den gestrichelten Linien angedeutet sind, kann die Umwandlungsarbeit errechnet werden (siehe Text). Die zweite Expansionskurve (lila) liegt nahezu deckungsgleich auf der Ersten. Dies demonstriert die erstaunliche Stabilität und Reversibilität der Protein-Grenzschicht (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, pH 6,9).

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

Das errechnete Kompressibilitätsmaximum von $0,3 \text{ m/mN}$ bei einem Druck von $18,6 \text{ mN/m}$ im Inset von Abbildung 3.4 illustriert diese Aussage noch einmal nachdrücklich. Zu größeren Flächen hin nimmt die Steigung der Isothermen wieder zu und dementsprechend wird die Kompressibilität der Grenzschicht kleiner. Bei Lipiden ist dieses dreiphasige Verhalten auf die Phasenumwandlung zurückzuführen. Im Fall eines Proteins ist die Interpretation etwas schwieriger. In der Literatur wird der horizontale Bereich der Isothermen typischerweise mit einer Konformationsänderung des Proteins begründet [91, 92]. Die zwei unterschiedlichen Proteinkonformationen entsprechen im übertragenen Sinne somit zwei verschiedenen Lipidphasen. Auch ohne die genaue molekulare Struktur der Katalase zu kennen, können wir aus dem thermodynamischen Zustandsdiagramm wertvolle Informationen gewinnen. So weist der Umwandlungsbereich des Proteins eine sehr hohe Kompressibilität auf, die teilweise sogar die Werte reiner Lipidgrenzschichten übertrifft [44]. Gleichzeitig kann die Flächenarbeit πdA , die zur Umwandlung der Enzyme aufgewendet werden muss, aus dem Zustandsdiagramm extrahiert werden. Integriert man die Fläche unterhalb des Umwandlungsbereichs der Isothermen, so kommt man auf eine Übergangsenergie zwischen den beiden Enzymkonformationen von $1,68 \cdot 10^{-19} \text{ Kalorie/Molekül}$ oder 101 kcal/mol . Dies entspricht in der Tat typischen Umwandlungsenergien von Proteinen. Deren Umwandlung läuft häufig irreversibel ab und wird deshalb als Denaturierung bezeichnet. Bei der Katalase ist dies aber definitiv nicht der Fall. Abbildung 3.4 demonstriert eindrucksvoll die extreme Stabilität der Katalasemonolage. Die zweite Expansionskurve liegt fast deckungsgleich auf der Ersten. Demzufolge kann man davon ausgehen, dass die Konformationsänderung vollkommen reversibel von Statten geht und nur wenige Katalase-Moleküle in die Subphase übergehen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Literaturdaten [91].

Zur Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen dem Zustand der Monolage und der Enzymaktivität, wird der Pyrogallol-Assay verwendet (vgl. Reaktion 3.17). In Anhang A.1 befinden sich die dazugehörigen Referenzmessungen. Bei der Autokatalyse des Substrats über einen Zeitraum von 20 Minuten hinweg beträgt die Intensitätsänderung in etwa zwei Prozent (vgl. Abbildung A.1a). In Anwesenheit einer Enzymmonolage verändert sich die Intensität in diesem Zeitraum dagegen typischerweise um mehr als 20% (vgl. Abbildung A.1b). Von daher kann die Autokatalyse des Substrats während der Messungen vernachlässigt werden. Die Transmission nimmt bei Messungen mit konstantem Lateraldruck, wie nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz zu erwarten, exponentiell mit der Konzentration des Produkts ab (vgl. Abbildung A.1b):

$$I_1 = I_0 \exp(-\varepsilon cd) \quad (3.18)$$

I_1 steht dabei für die Intensität des transmittierten Lichts, I_0 für die Intensität des einfallenden Lichts, ε für den Extinktionskoeffizienten, c für die Produktkonzentration und d für die Schichtdicke. Folglich ist die Aktivität der Enzyme bei festem Lateraldruck näherungsweise

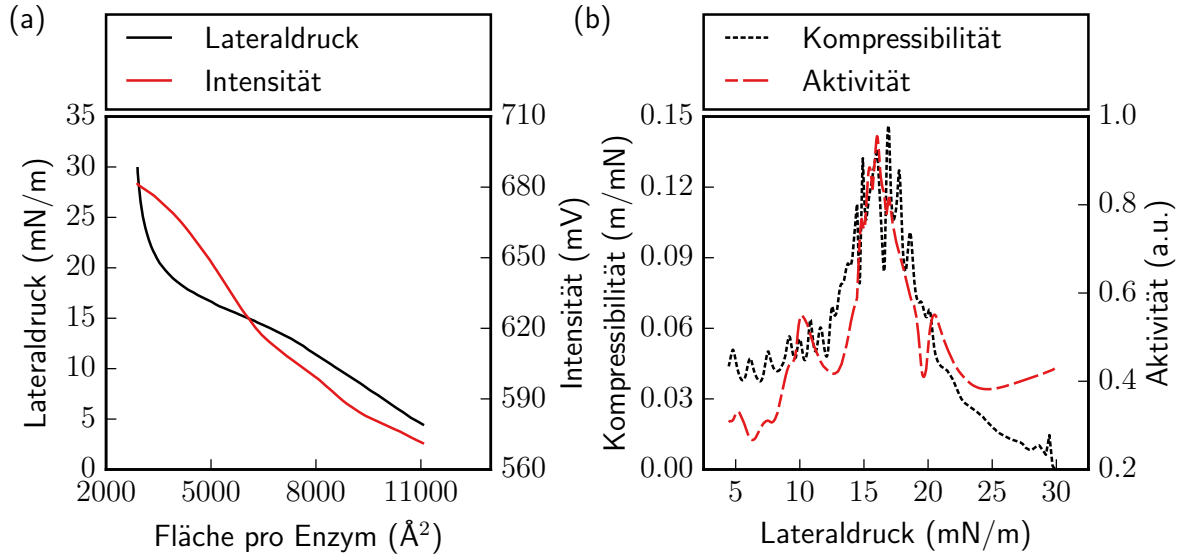


Abbildung 3.5.: Isotherme Expansion einer Katalasemonolage: **(a)** Während der Expansion der Monolage wird simultan die Produktkonzentration in der Subphase über die transmittierte Lichtintensität gemessen. Im Bereich der Konformationsumwandlung des Enzyms sinkt die Intensität deutlich ab, was nichts anderes bedeutet, als dass das Enzym hier sehr aktiv ist. Noch besser ist dieser Zusammenhang zu erkennen, wenn man Kompressibilität und Aktivität über den Lateraldruck aufträgt: **(b)** Die beiden Messkurven zeigen eine klare Korrelation. Im Maximum der Kompressibilität, d. h. wenn die Proteinfluktuationen am größten sind, ist die Aktivität des Enzyms ebenfalls maximal und damit auch die Fluktuationen der Reaktionskoordinate ξ (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, pH 6,9, 0,1 M H_2O_2 , 5 mM Pyrogallol).

konstant:

$$k = \frac{dc}{dt} \propto -\frac{d}{dt} [\log(I_1)] \quad (3.19)$$

Wie wir im Folgenden sehen werden, verändert sich im Gegensatz dazu die Aktivität der Enzymmonolage bei Kompression bzw. Expansion signifikant.

3.3.3. Zustandsabhängigkeit der Katalase

Abbildung 3.5a zeigt eine repräsentative Katalase-Aktivitätsmessung bei konstanter quasi-statischer Expansion der Monolage. Zunächst fällt auf, dass das Substrat in der Subphase praktisch keinen Effekt auf den Verlauf der Isothermen besitzt. Die aufgezeichnete Kurve, inklusive des kritischen Übergangsbereichs, gleicht weitgehend der Messung ohne Substrat (vgl. Abbildung 3.4). Zudem springt der zum Lateraldruck gegenläufige Verlauf des Transmissionsignals ins Auge. Die simultan aufgezeichnete Transmissionsintensität sinkt zunächst relativ

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

langsam, fällt dann aber im horizontalen Umwandlungsbereich der Isothermen rapide ab, bevor sie zum Ende hin wieder abflacht. Der schnelle Abfall ist auf eine hohe Purpurogallin-Produktion zurückzuführen und resultiert folglich aus einer hohen Enzymaktivität. Aus den beiden Kurvenverläufen lassen sich die Kompressibilität und die Aktivität der Katalasemonolage berechnen (vgl. Gleichungen 2.15 und 3.19). In Abbildung 3.5b sind sie gegen den Lateraldruck aufgetragen. Überraschenderweise zeigen beide einen fast uniformen Verlauf. Im Bereich in dem die Grenzschicht maximal kompressibel ist ($\approx 14\text{--}20\text{ mN/m}$), also die mittlere Enzymfläche stark fluktuiert, weisen die Enzyme die höchste Aktivität auf. Offensichtlich korrelieren die Flächenfluktuationen und die Fluktuationen der Reaktionskoordinate ξ , oder allgemeiner ausgedrückt: Es besteht eine Korrelation zwischen den physikalischen Eigenschaften der Grenzschicht und dem biochemischen Vorgang der Katalyse. Somit reiht sich die katalytische Rate k in die Proportionalität zwischen den Messgrößen aus Gleichung 2.17 ein:

$$\Delta k \propto \Delta \kappa_T \propto \Delta c_\pi \propto \Delta C_T \propto \Delta \alpha_\pi \quad (3.20)$$

Die Proportionalität zwischen den Messgrößen folgt aus den gekoppelten Fluktuationen der Observablen, was letztlich auf ein gemeinsames Entropiepotential zurückzuführen ist: $S(n_i) = S(A, E, \psi, \xi \dots)$. Durch die Adsorption des Substrats an ein Katalasemolekül, wird es Teil der Grenzschicht. Somit ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung für die möglichen Zustände der Reaktionskoordinate ξ durch das Entropiepotential vorgegeben und die Rate folgt aus dem Fluktuations-Dissipations-Theorem (vgl. Gleichung 3.9). Weiterhin kann aus dem Experiment geschlossen werden, dass sich das Entropiepotential der Grenzschicht durch die Adsorption der Substratmoleküle nicht stark verändert, sondern „kritische Bereiche“ weiterhin „kritisch“ bleiben, wie beispielsweise der Umwandlungsbereich der Grenzschicht, und Bereiche mit geringen Fluktuationen weiterhin nur gering fluktuieren.

Um sicherzugehen, dass es sich bei dieser Messung um kein Artefakt handelt, wird in einem ersten Schritt die Expansionsgeschwindigkeit variiert. Durch eine Erhöhung auf das Doppelte der ursprünglichen Geschwindigkeit ($550\text{ \AA}^2/\text{min}$), können mögliche Konvektions- bzw. Diffusionseffekte ausgeschlossen werden. Dennoch korreliert auch hier die Aktivität eindeutig mit der Kompressibilität (siehe Abbildungen 3.6a/b). Beide werden maximal im Umwandlungsbereich der Grenzschicht ($14\text{--}20\text{ mN/m}$). Dass dieses Phänomen ebenfalls unabhängig von der Art der Isothermenaufnahme ist (Expansion vs. Kompression), wird durch die Abbildungen 3.6c/d nachgewiesen. Die Katalasemonolage wird hier mit einer Geschwindigkeit von $1100\text{ \AA}^2/\text{min}$ komprimiert. Obwohl der Umwandlungsbereich mit dem Auge weniger gut auszumachen ist als in den Expansionskurven, folgt die Aktivität doch eindeutig dem Verlauf der Kompressibilität (vgl. Abbildung 3.6d).

Folglich besteht die Korrelation unabhängig von Kompression und Expansion sowie möglichen Geschwindigkeitseffekten und kann daher als allgemein angesehen werden. Leider ist der Abbau des Pyrogallols durch die Katalase auf einen sehr kleinen pH-Bereich

3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen

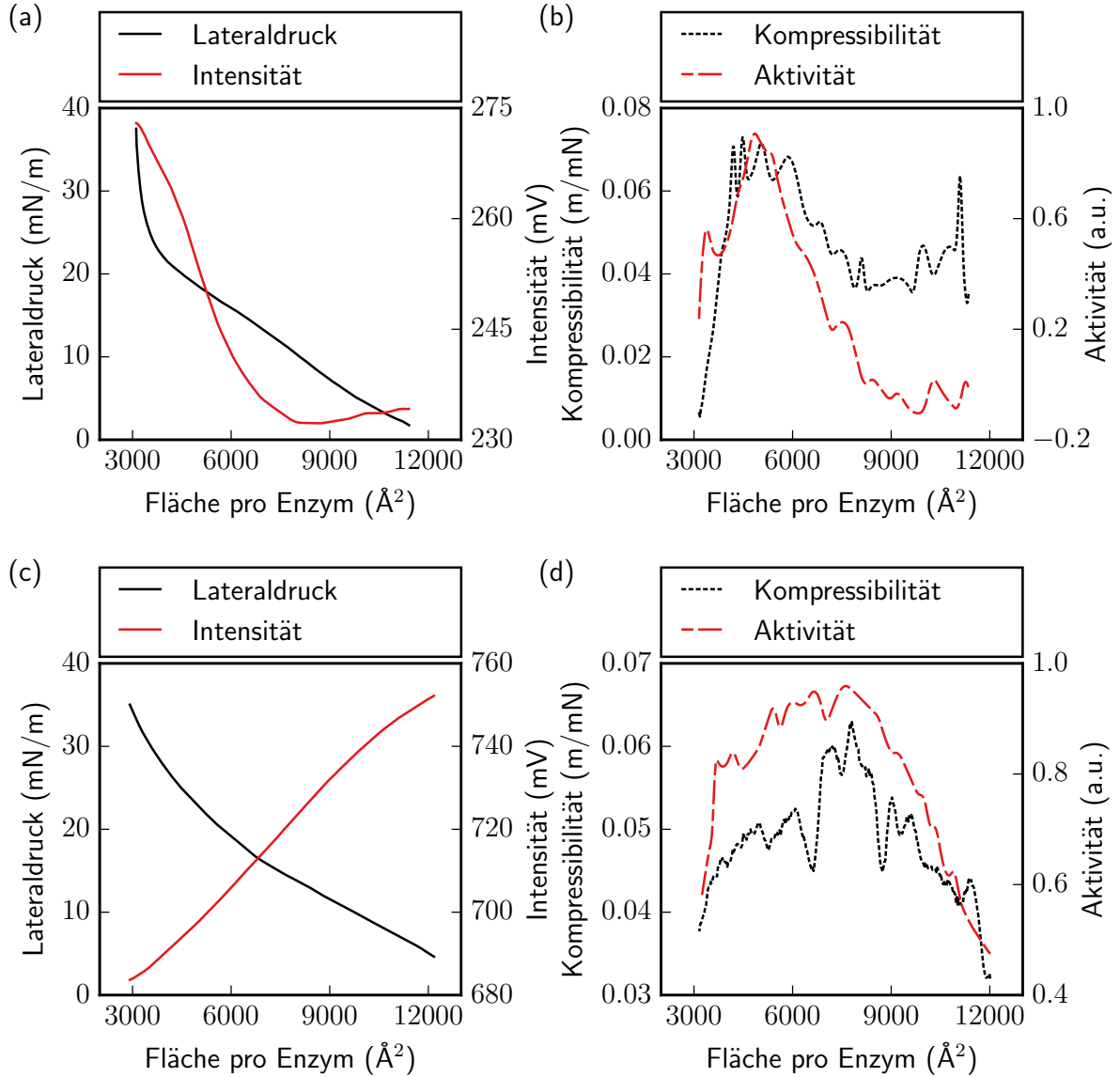


Abbildung 3.6.: Invarianz der Korrelation zwischen Kompressibilität und Aktivität: (a)/(b) Durch die Variation der Expansionsgeschwindigkeit auf das Doppelte des ursprünglichen Wertes, können Diffusions- bzw. Konvektionseffekte als Erklärung für die gefundene Korrelation ausgeschlossen werden. Auch in diesem Fall treten die Maxima der beiden Messgrößen im gleichen Druckbereich auf. (c)/(d) Die Korrelation besteht weiterhin, wenn die Monolage komprimiert anstatt expandiert wird und ist damit unabhängig von der Art der Isothermenaufnahme (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, pH 6,9, 0,1 M H_2O_2 , 5 mM Pyrogallol).

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

beschränkt. Deshalb kann mit diesem System nicht untersucht werden, ob die beobachtete Korrelation pH invariant ist. Dies wollen wir im Folgenden an einem anderen System testen.

Bisher wurden reine Enzymmonolagen betrachtet. Dass die mechanischen Eigenschaften und die Aktivität der Enzyme zusammenhängen, verwundert deshalb nicht unbedingt (auch wenn hierüber, meinem Wissen nach, noch keine Literatur existiert). Was aber passiert in dem biologisch noch relevanteren Fall, wenn Enzyme Teil einer Lipidgrenzschicht sind? Für diese Experimente greifen wir auf ein Enzym aus der Gruppe der Peroxidasen zurück.

3.3.4. Vorstellung der Meerrettichperoxidase

Die Meerrettichperoxidase wird, wie der Name schon andeutet, aus den Wurzeln des Meerrettichs extrahiert und typischerweise mit HRP für das englische *horseradish peroxidase* abgekürzt. Die HRP oxidiert eine Vielzahl von Substanzen bei gleichzeitiger Reduktion eines Peroxids (meist Wasserstoffperoxid H_2O_2) [90]. Die hier verwendete Form der HRP (Typ VI-A) stammt von *Sigma-Aldrich* und besitzt eine Masse von ca. 44 kDa. Das aktive Zentrum wird, wie schon bei der Katalase, von einer Häm-Gruppe gebildet [93]. In der Natur steuern die Peroxidasen eine ganze Reihe von Funktionen, wie beispielsweise Wachstum, Differenzierung und Entwicklung von Pflanzenzellen [93]. Aufgrund seiner oxidierenden Wirkung auf eine Unzahl von Donatoren, wird das Enzym in der Biotechnologie gerne zum Nachweis verschiedenster Substanzen verwendet. Die oxidierten Reaktionsprodukte zeichnen sich dabei meist durch eine leicht nachweisbare Farbe bzw. Fluoreszenz aus [93]. Wie bei der Katalase kann die Aktivität der Peroxidase über den Abbau von Pyrogallol kolorimetrisch bestimmt werden (vgl. Reaktionsgleichung 3.17) [94]. Die HRP bietet aber den zusätzlichen Vorteil, dass sie ohne Donator nicht in der Lage ist Wasserstoffperoxid abzubauen. Von daher konkurrieren nicht zwei Reaktionen um das Wasserstoffperoxid in der Subphase und die Reaktion kann pH-abhängig analysiert werden. Um sicherzugehen, dass die HRP während der Experimente an die Grenzschicht gebunden ist, werden die Enzyme auf eine DPPG-Monolage zugegeben und dabei der Lateraldruck der Grenzschicht aufgezeichnet (Referenzmessung siehe Anhang A.2). Wie in der Referenzmessung zu sehen ist, führt dies zu einem irreversiblen Druckanstieg. Das heißt, die Enzyme bauen sich in die Grenzschicht ein und sind damit, wie die Lipide, eventuellen Lateraldruckänderungen ausgesetzt. Da jedoch ein Teil der hinzugefügten Enzyme in die Subphase übergeht und folglich die Aktivitätsmessung der gebundenen HRP-Moleküle überlagert, wird die nachstehende Methodik verwendet.

3.3.5. Methodik der Aktivitätsmessung

Die HRP wird im linken Teil der Filmwaage vorsichtig zwischen die beiden Barrieren auf die Lipidmonolage getropft und dort mit einer Pipette verteilt (siehe Abbildung 3.7). Nach 15 Minuten werden die Barrieren bei gleichbleibendem Abstand in die Filmwaagenmitte gefahren und somit die enzymhaltige Lipidmonolage auf den enzymfreien Bulk transferiert.

3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen

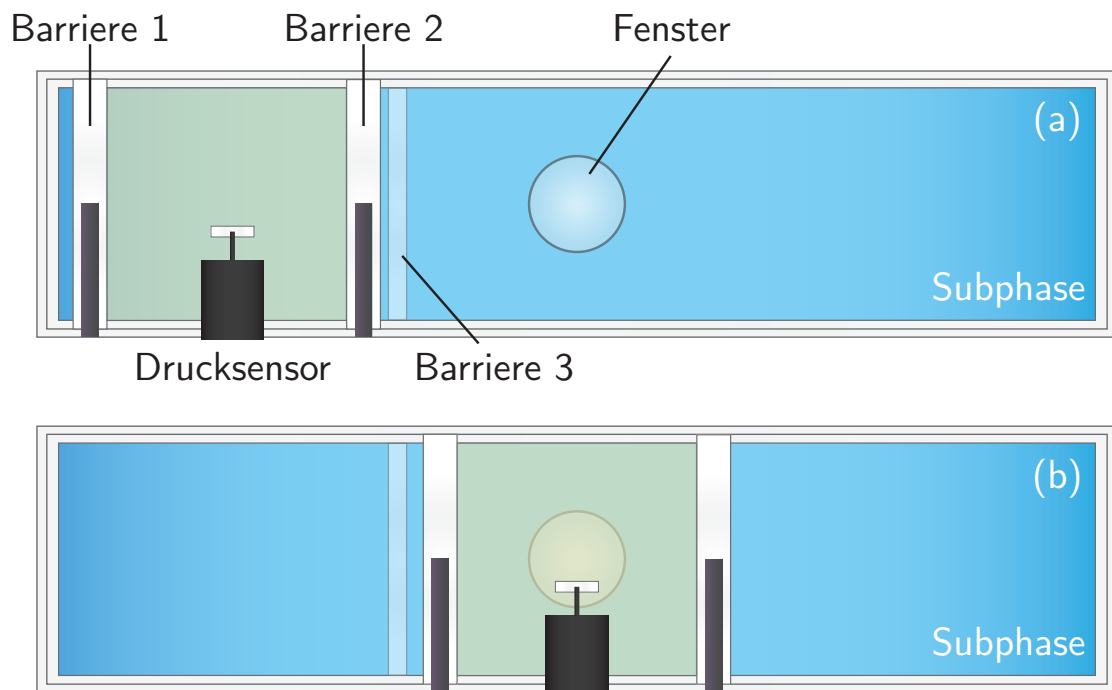


Abbildung 3.7.: Methodik der HRP-Messung: **(a)** Die HRP wird auf eine Lipidmonolage zwischen die Barrieren 1 und 2 gegeben. Dies ist durch die Gelbfärbung der Subphase illustriert. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten werden die beiden Barrieren sowie der Drucksensor zur Mitte gefahren, wo die Aktivität der Enzyme zustandsabhängig untersucht wird **(b)**. In der Subphase befindet sich eine dritte Barriere, die bis knapp unter die Wasseroberfläche reicht. Sie verhindert, dass Enzyme, die nicht an die Lipidschicht binden, in die Filmwaagenmitte gelangen und dort die Aktivitätsmessung der Grenzschicht überlagern.

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

Zudem verhindert eine zusätzliche Barriere am Filmwaagenboden die unerwünschte Konvektion/Diffusion der nicht gebundenen Enzyme. Anschließend kann das Zustandsdiagramm der Monoschicht bei gleichzeitiger Aktivitätsmessung aufgezeichnet werden. Durch dieses Vorgehen können störende Effekte der freien Enzymmoleküle auf die Aktivitätsmessung zum Großteil ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz verbleibt noch eine weitere Fehlerquelle: die inhomogene Verteilung der Enzyme in der Lipidmonolage. Dies kann in der Folge zu einer räumlich heterogenen Produktkonzentration und damit zu Konvektions- und Diffusionseffekten führen. Diese Fehlerquelle wurde bereits in anderen Arbeiten ausführlich diskutiert [34, 24] und kann sich beispielsweise als „negative Aktivität“ in den Messkurven äußern. Unabhängig davon kristallisiert sich aber auch in diesen Experimenten ein eindeutiges Verhalten heraus.

3.3.6. Zustandsabhängigkeit der Meerrettichperoxidase

Abbildung 3.8 zeigt den Einfluss der Enzyme auf das Zustandsdiagramm von DPPG. Die reine Lipidschicht besitzt einen sehr scharfen Phasenübergang bei ca. 9,5–10,5 mN/m. Durch die Integration der Enzyme in die Lipidmonolage, schmiert dieser Übergangsbereich aus und der Anfangsdruck des Phasenübergangs wird leicht nach oben verschoben. Die einzelnen Phasenzustände sind nicht mehr so scharf voneinander abgetrennt wie während der reinen Lipidmessung. Folglich nimmt die Kompressibilität der Grenzschicht im Phasenübergang etwas ab, verbleibt aber weiterhin groß im Vergleich zu den anderen Phasen.

Wie wirkt sich der Zustand der Grenzschicht nun auf die Aktivität der Enzyme aus? Koppeln die Eigenschaften der Lipide und der HRP oder ist das Enzymverhalten davon unabhängig?

Abbildung 3.9a illustriert das isotherme Verhalten einer DPPG-HRP-Monolage bei quasi-statischer Kompression. Der Phasenübergang der Monolage bei ca. 13 mN/m kommt durch einen sehr flachen Verlauf der Flächen-Druck-Kurve zum Vorschein. Gleichzeitig fällt die Intensität in diesem Bereich rapide ab. Demzufolge wandeln die Enzyme dort viele Pyrogallolmoleküle pro Zeiteinheit in das absorbierende Purpurogallin um und sind daher sehr aktiv. Wie ausgeprägt die Kopplung zwischen den mechanischen Eigenschaften der Grenzschicht und der Enzymaktivität ist, wird durch die Auftragung von Kompressibilität und Aktivität gegen den Lateraldruck sichtbar (siehe Abbildung 3.9b). Im Phasenübergang der Grenzschicht nimmt sowohl die Kompressibilität als auch die Enzymaktivität signifikant zu. Folglich korrelieren die Flächenfluktuationen der Grenzschicht mit dem biochemischen Vorgang der Katalyse. Die Lipide wirken regulativ auf die Enzymaktivität – nur im Phasenübergang sind die Enzyme maximal aktiv.

Im Fall der Katalase wurde eine Korrelation zwischen den Enzymfluktuationen und der Enzymaktivität beobachtet. Die Experimente mit der DPPG-HRP-Monolage sind ein Zeichen dafür, dass die Korrelation noch weiter verallgemeinert werden kann: Sind die Enzyme Teil einer größeren Grenzschicht, wird deren katalytische Rate eine zustandsabhängige Größe des

3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen

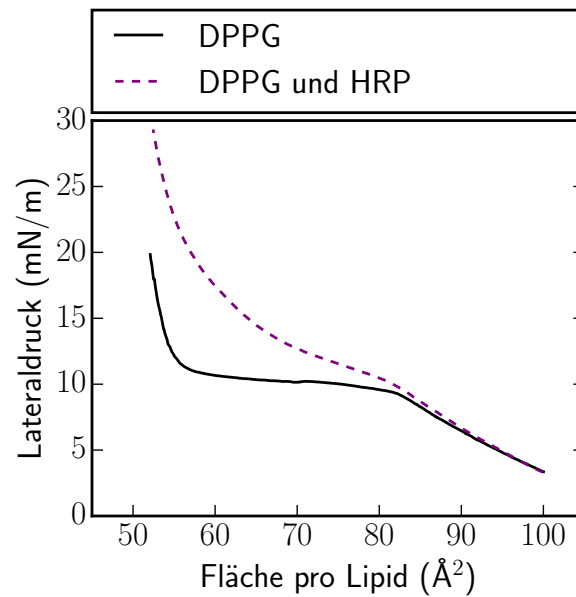


Abbildung 3.8.: Isothermenvergleich einer reinen DPPG-Monolage mit einer DPPG-HRP-Monoschicht: Der Phasenübergang der reinen Lipidschicht tritt über einen extrem schmalen Druckbereich auf (9,5–10,5 mN/m). Folglich ist die Kompressibilität dort sehr hoch – das System wird enorm weich. Durch den Einbau der Enzyme in die Monolage weitet sich dieser Bereich deutlich aus. Die Phasenzustände sind nicht mehr klar voneinander getrennt. Trotzdem besitzt die Grenzschicht im Phasenübergang immer noch eine klar erhöhte Kompressibilität (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, pH 7,0, 0,1 M H₂O₂, 5 mM Pyrogallol).

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

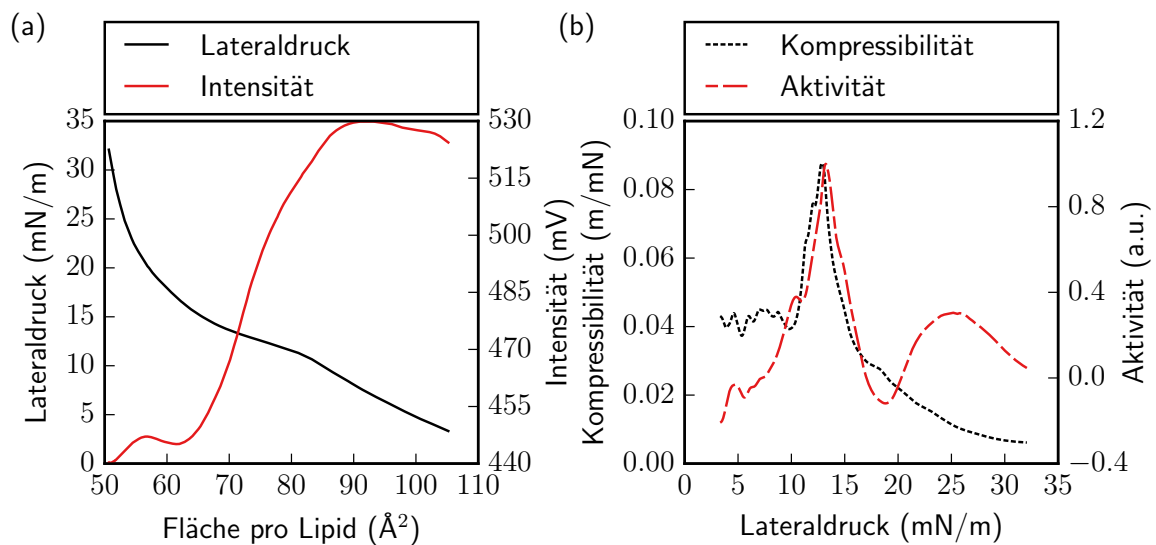


Abbildung 3.9.: Einfluss einer DPPG-Lipidschicht auf die Aktivität der HRP: **(a)** Beim Komprimieren der Lipid-Enzym-Monolage nimmt die gemessene Intensität zunächst nicht ab. Sobald die Grenzschicht in den Phasenübergang gelangt, kommt es aber zu einem starken Abfall. Das bedeutet, dass viele Substratmoleküle vom Enzym umgewandelt werden. Aus den beiden Kurvenverläufen lassen sich die entsprechende Kompressibilität und Aktivität der Monolage errechnen **(b)**. Die gemeinsam aufgetragenen Messgrößen offenbaren die bestehende Korrelation. Im Phasenübergang der Grenzschicht besitzen beide ein Maximum. Folglich sind dort nicht nur die Fluktuationen der Fläche maximal, sondern auch der Reaktionskoordinate ξ (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, pH 7,0, 0,1 M H_2O_2 , 5 mM Pyrogallol).

3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen

Gesamtsystems. Die Fluktuationen der ganzen Grenzschicht kontrollieren die Aktivität der Enzyme.

Im Folgenden wird demonstriert, dass dieses Phänomen nicht von einer spezifischen Wahl der Observablen abhängt, sondern allgemeingültig ist. Deshalb wird als erstes die Temperatur, bei der die isotherme Messung durchgeführt wird, variiert. In Abbildung 3.10 wird die Monolage bei 20 °C bzw. 25 °C expandiert. Aufgrund der wärmeren Temperatur verschiebt sich der Phasenübergang und damit der Bereich maximaler Kompressibilität hin zu höheren Lateraldrücken. Gleichzeitig beobachten wir eine Verschiebung des Aktivitätsmaximums in Einklang mit den mechanischen Eigenschaften der Grenzschicht. Folglich ist die Korrelation temperaturinvariant.

Dass dieser Effekt nicht nur spezifisch für DPPG auftritt, sondern lipidunabhängig ist, zeigen die Experimente mit DMPS (Abbildung 3.11). Auch während der Expansion einer DMPS-Monolage korrelieren Aktivität und Kompressibilität miteinander. Der Effekt ist also ebenfalls invariant gegenüber der molekularen Zusammensetzung der verwendeten Grenzschicht. Durch die Variation des pH-Wertes der Subphase kann nachgewiesen werden, dass der Effekt obendrein unabhängig von chemischen Einflüssen ist (ebenfalls Abbildung 3.11). Eine Erhöhung des pH-Wertes von 7 auf 8 verschiebt das Kompressibilitätsmaximum um ca. 7 mN/m. Parallel dazu verhält sich die Aktivität, die ebenfalls erst bei höheren Lateraldrücken maximal wird. Zugleich erkennt man an dieser Kurve, dass die Maxima in Aktivität und Kompressibilität aufgrund von Konvektions- und Diffusionseffekten leicht verschoben bzw. „ausgeschmiert“ auftreten können.

Zusammengefasst zeigt sich, dass die gefundene Korrelation zwischen dem Zustand der Grenzschicht und der Enzymaktivität invariant bezüglich chemischen (pH-Wert), physikalischen (Temperatur) und sogar molekularen Einflüssen (Lipid) ist. Daher kann dieses Phänomen als allgemeingültig angesehen werden. Die Tatsache, dass die Enzyme Phospholipase A₂, Phospholipase C und Acetylcholinesterase gleichfalls maximal aktiv im Phasenübergang von Lipidschichten sind, unterstreicht, wie weitreichend diese Korrelation ist. Offensichtlich spielt die Physik, in der Form des Phasenzustands der Grenzschicht, eine grundlegende regulative Rolle für die Biochemie.

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

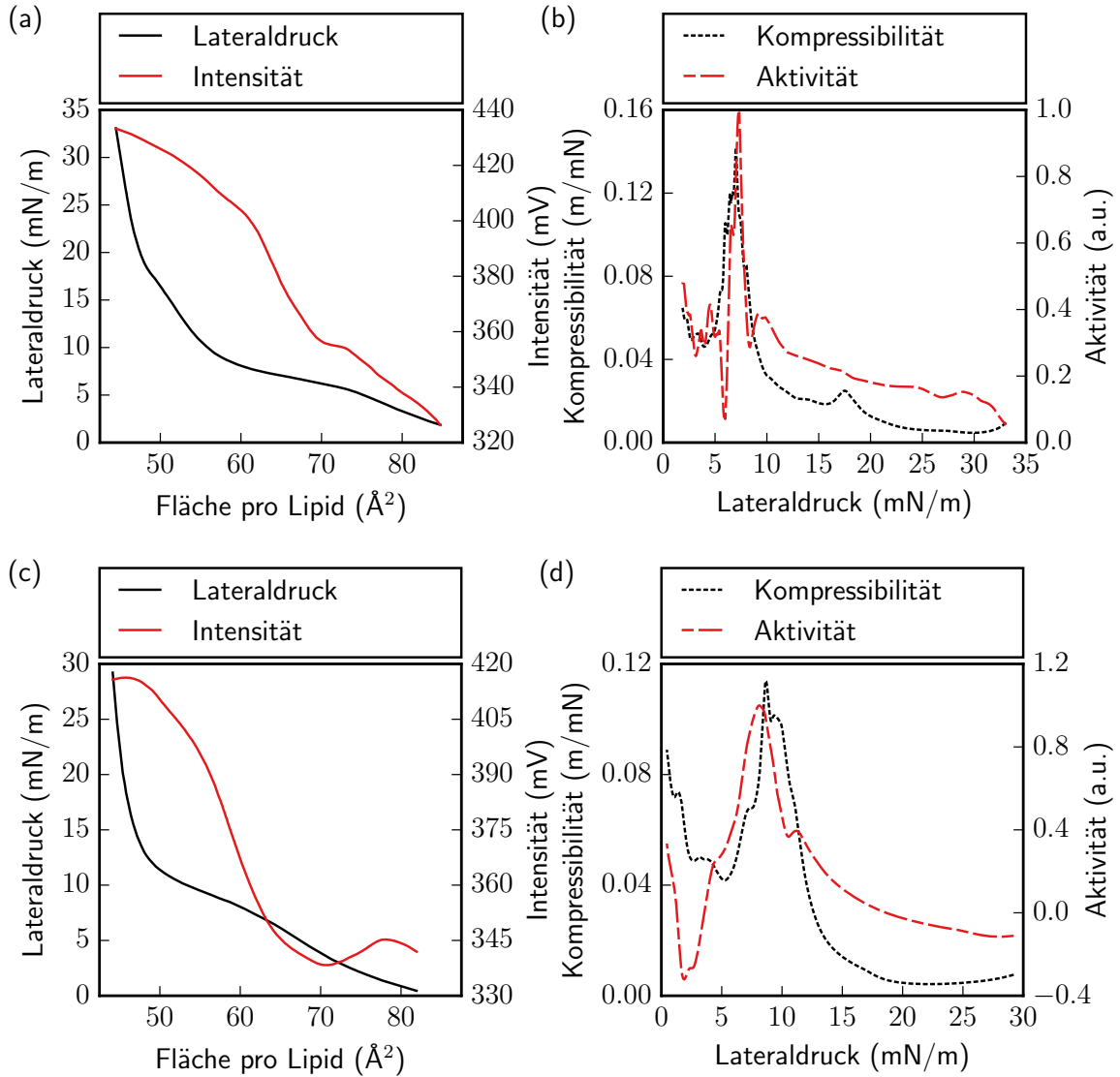


Abbildung 3.10.: Temperaturinvarianz: Die DPPG-HRP-Grenzschicht wird bei 20 °C (a) und 25 °C (c) quasi-statisch expandiert. Die Temperaturerhöhung führt zu einer Verschiebung des Phasenübergangs um ca. 4 mN/m. Dies ist eindeutig anhand der Kompressibilitätskurven in (b) und (d) zu erkennen. Gleichzeitig verschiebt sich auch das beobachtete Aktivitätsmaximum. Dies unterstreicht die Temperaturinvarianz der Korrelation zwischen Zustand und Enzymaktivität (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,1 M H₂O₂, 5 mM Pyrogallol).

3.3. Experimentelle Untersuchung zur Zustandsabhängigkeit von Enzymen

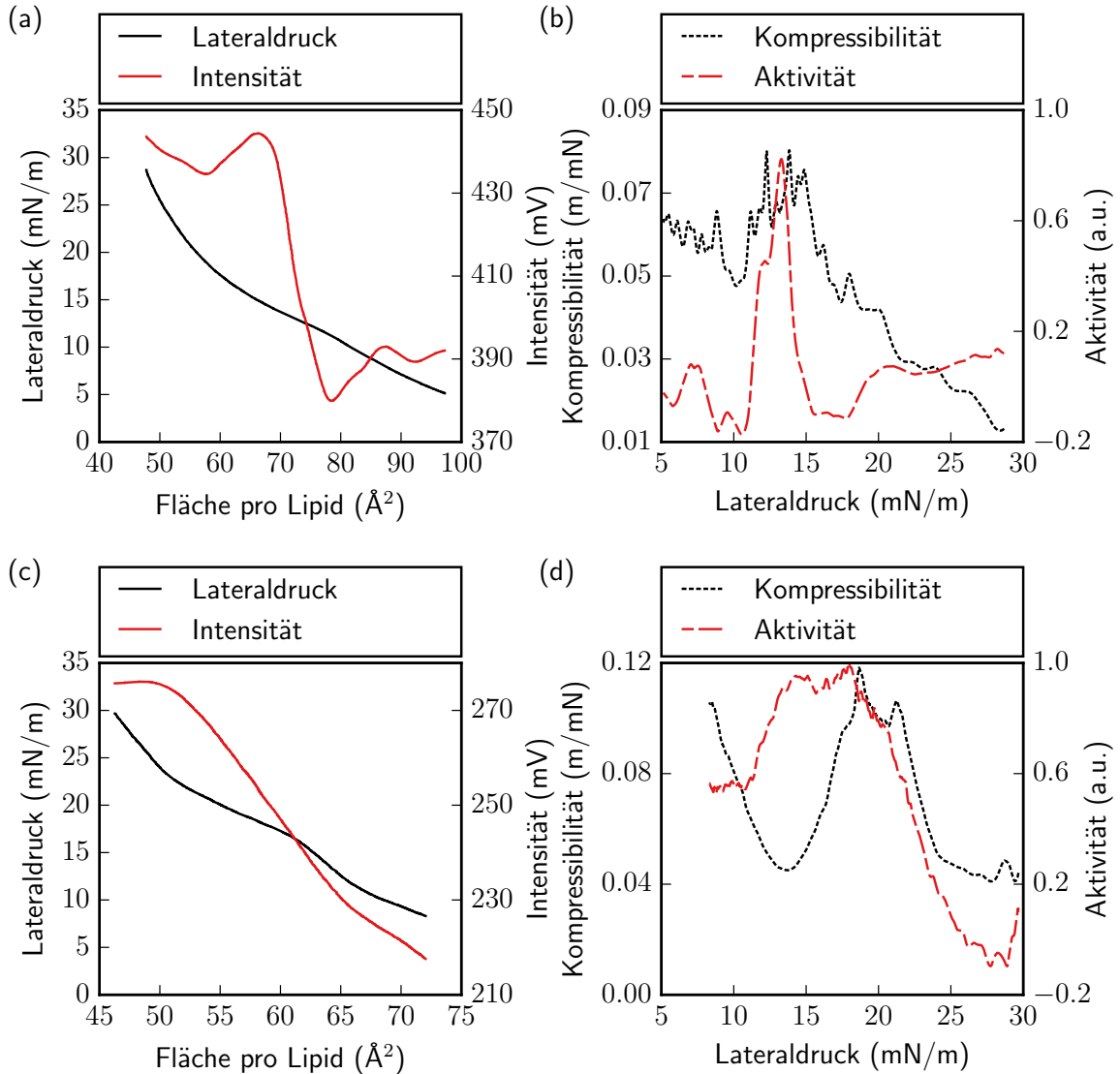


Abbildung 3.11.: pH-Invarianz: (a)/(b) Expansion einer DMPS-HRP-Monolage bei pH 7: Die Aktivität wird maximal im Phasenübergang der Grenzschicht (11–16 mN/m). Erhöht man den pH in der Subphase auf 8, verschiebt sich der Übergangsbereich der Grenzschicht zu höheren Drücken (15–25 mN/m) (c)/(d). Das Aktivitätsmaximum verlagert sich unisono zu höheren Drücken. Aufgrund von Konvektionseffekten ist es in diesem Fall etwas „ausgeschmiert“. Diese Experimente belegen die Unabhängigkeit der Korrelation von der molekularen Zusammensetzung der Grenzschicht, sowie von chemischen Einflüssen (pH) (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 15 °C, 0,1 M H_2O_2 , 5 mM Pyrogallol).

3.4. Diskussion der Ergebnisse auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene

Im Folgenden werden die gefundenen Ergebnisse mit Hilfe der Theorie von Kaufmann diskutiert und eine mögliche mikroskopische Erklärung dafür vorgeschlagen.

3.4.1. Thermodynamische Diskussion der Experimente

Die Theorie von Konrad Kaufmann bietet eine mögliche Erklärung für die beobachtete Korrelation zwischen Zustand und Enzymaktivität. Wie in Abschnitt 3.2 diskutiert, beginnt sie mit einer entropischen Beschreibung des Systems und nicht wie üblich, mit einem Energiebild. Die Energie stellt nur eine Observable unter vielen dar und muss demzufolge, wie alle thermodynamischen Größen, fluktuieren. Die Katalyse folgt aus einem kritischen Zustand des Enzym-Substrat-Komplexes, der durch die Absorption eines Substratmoleküls an das Enzym induziert wird. In diesem Fall werden die Fluktuationen der Reaktionskoordinate ξ enorm groß („kritisch“) und die im Bulk gemessene hohe Rate folgt aus dem Fluktuations-Dissipations-Theorem (vgl. Gleichung 3.9). Ist das Enzym Teil einer größeren Grenzschicht, wie beispielsweise im Fall der Katalase einer reinen Enzymmonolage, wird die Observable ξ zu einer Variablen des Gesamtentropiepotentials der Grenzschicht: $S(A, q, T, \xi \dots)$. Wie die Experimente eindeutig belegen, koppeln in diesem Fall die Fluktuationen der Fläche und der Reaktionskoordinate. Der Zustand des Gesamtsystems kontrolliert die Aktivität der Enzyme. Erstaunlicherweise gilt dies aber nicht nur für den Fall reiner Enzymmonolagen, sondern wie die HRP-Experimente zeigen, auch für Lipid-Enzym-Systeme. Die thermodynamischen Fluktuationen der Observablen koppeln über die Maxwell-Relationen miteinander. Wie stark die Kopplung zwischen den Fluktuationen der Fläche und der Reaktionskoordinate selbst im Fall eines Lipid-Enzym-Systems ist, sieht man an den parallelen Maxima von Kompressibilität und Aktivität. Dieser Effekt muss, wie in Abschnitt 3.2.3 ausführlich diskutiert, natürlich nicht für jedes Lipid-Enzym-System eintreten. Kommt es zu einer Phasenseparation zwischen den Lipiden und den Enzymen und ist die Kopplung der beiden Systeme gering, können sie sich theoretisch auch vollständig unabhängig voneinander verhalten. Die Experimente mit der HRP, sowie die vorhergehenden Ergebnisse mit der Acetylcholinesterase und der Phospholipase A₂ weisen aber daraufhin, dass die Kopplung der Systeme wahrscheinlich den Normalfall darstellt. Es stellt sich deshalb offensichtlich die Frage, wie sich die Korrelation zwischen Enzymaktivität und Zustand mikroskopisch verstehen lässt?

3.4.2. Mikroskopischer Erklärungsversuch

Wie bereits in Kapitel 2 besprochen wurde, sind im Phasenübergang von Lipidschichten die Änderungen der Kompressibilität, der Wärmekapazität und der elektrischen Kapazität proportional zueinander (vgl. Gleichung 2.17). Dies bedeutet nichts anderes, als dass die

Fluktuationen der Fläche, der Energie und der Ladung miteinander gekoppelt sind. Mit Hilfe der Filmwaage kann der Zustand des Systems genau eingestellt werden. In der flüssig-kondensierten bzw. flüssig-expandierten Phase ist die Grenzschicht relativ starr. Das heißt, die Enzyme, die in einem „Meer an Lipiden und gebundenen Wassermolekülen“ treiben, sind in ihrer Bewegungsfreiheit stark eingeschränkt. Im Phasenübergang hingegen nehmen die lokalen Flächenfluktuationen enorm zu. Dementsprechend können bzw. müssen die Enzyme viel stärker fluktuieren als zuvor. Gleichzeitig werden auch die Ladungsfluktuationen der Grenzschicht maximal. Aufgrund ihrer geringen Größe und damit hohen Diffusionsgeschwindigkeit, gilt dies im besonderen Maße für die Protonen. Da die Protonen Teil der katalysierten Reaktionsgleichung sind (Es kommt zu einem Protonenübertrag), koppeln diese mit der Reaktionskoordinate ξ und erhöhen folglich nach Gleichung 3.9 die Reaktionsrate. Die Fluktuationen des makroskopischen Gesamtsystems bestimmen so die lokalen Fluktuationen am Enzym und damit dessen Aktivität. Demnach verringert sich die Aktivität der Enzyme in Phasen mit geringen Fluktuationen (Gel-/Fluide-Phase bzw. flüssig-kondensierte/flüssig-expandierte Phase). Makroskopisch ausgedrückt bedeutet dies, dass der Zustand des Gesamtsystems die Funktion der Einzelenzyme kontrolliert. Dieser Effekt ist für zwei Extremfälle in Abbildung 3.12 dargestellt.

Die bis zu diesem Zeitpunkt erörterten Messungen waren alle makroskopischer Natur. Um zu beweisen, dass die Korrelation zwischen Zustand und Aktivität auch für Einzelenzyme gilt, wurden AFM-Experimente mit dem Enzym Acetylcholinesterase durchgeführt (siehe Anhang A.3). Dabei wurden die Höhenfluktuationen einzelner Enzyme während der Katalyse pH-abhängig untersucht. Leider ist die Standardabweichung der Messwerte zu groß, um eine sichere Aussage treffen zu können. Nichtsdestotrotz folgen die mittleren gemessenen Höhenfluktuationen dem Verlauf der Enzymaktivität (siehe Abbildung A.3). Dies unterstützt die Annahme, dass die erzielten Ergebnisse auch auf mikroskopischer Ebene gültig sind. Da die AFM-Messungen an Einzelenzymen keine ausreichende Genauigkeit bieten, schlagen wir als Alternativmethode die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie vor. Damit können nicht nur freie Einzelmoleküle spektroskopisch untersucht werden [95, 96, 97], sondern darüber hinaus auch Enzyme in Lipidmonolagen [98, 99]. Somit stellt diese Methode eine Möglichkeit dar, die Ergebnisse der Filmwaagenexperimente auf mikroskopischer Ebene zu überprüfen.

3.5. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde nachgewiesen, dass die Enzymaktivität eine zustandsabhängige Größe darstellt. Dafür wurde zuerst ein reines Enzymsystem betrachtet. Die Katalase bildet eine stabile Enzymmonolage an der Wasser/Luft-Grenzfläche aus. Überraschenderweise weist die Isotherme des Systems ein dreiphasiges Verhalten auf, welches sehr an Lipidschichten erinnert. Im Bereich der höchsten Kompressibilität wird die Enzymaktivität maximal. Die Fluk-

3. Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

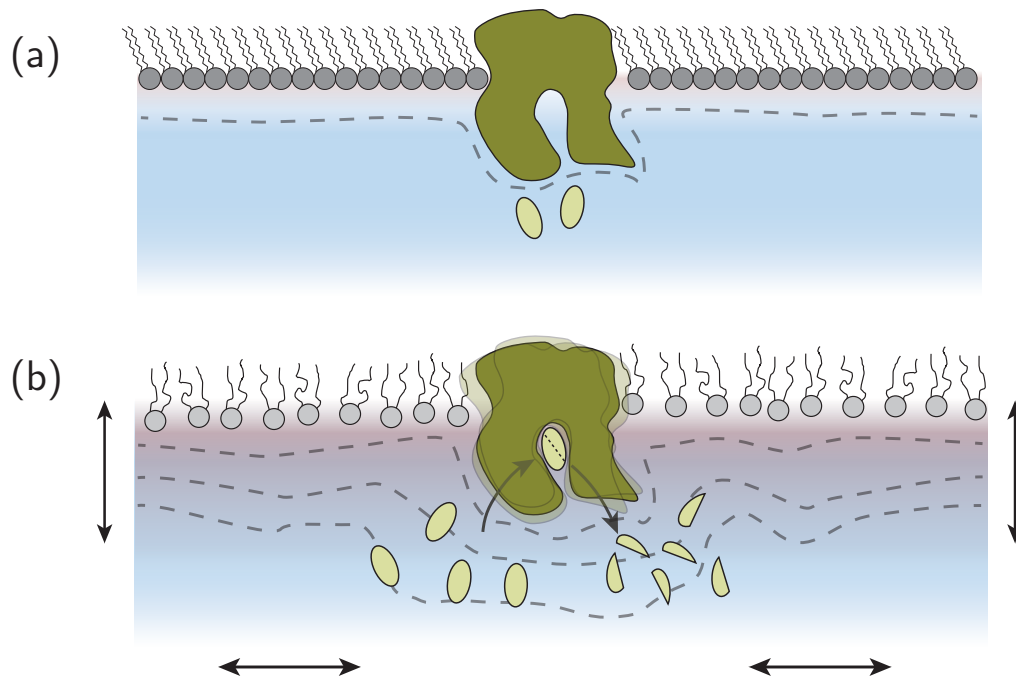


Abbildung 3.12.: Enzyme als Teil einer Lipidgrenzschicht: Der Zustand des Gesamtsystems kontrolliert die lokalen Fluktuationen. Befinden sich die Lipide beispielsweise in der flüssig-kondensierten Phase (Fall **(a)**), ist die Grenzschicht (bestehend aus Lipiden, Enzymen und gebundenem Wasser) sehr starr und die Bewegung der Enzyme darin eingeschränkt. **(b)** Gelangt das System in einen kritischen Zustand (Phasenübergang), nehmen die lokalen Flächen- und Ladungsfluktuationen der Grenzschicht stark zu. Dies ist anhand des überlagerten roten Farbverlaufs angedeutet. In diesem Fall erhöhen sich unweigerlich auch die Fluktuationen der Enzyme. Sind die Ladungen (Protonen) Teil der Reaktion, wie zum Beispiel bei der HRP, so können diese an die Fluktuationen der Reaktionskoordinate ξ koppeln. Im Phasenübergang der Grenzschicht sind die Enzyme dann maximal aktiv und es werden deutlich mehr Substratmoleküle pro Zeiteinheit abgebaut.

tuationen der Enzymfläche korrelieren dementsprechend mit der katalytischen Rate. Ferner konnte mittels der Meerrettichperoxidase gezeigt werden, dass dieser Effekt auch bei Enzym-Lipid-Systemen auftritt. Im Phasenübergang der Grenzschicht korrelieren Kompressibilität und Aktivität. Diese Korrelation ist unabhängig von chemischen (pH), physikalischen (Temperatur) und sogar molekularen Änderungen (Lipid) am System. Eine Möglichkeit um die Zustandsabhängigkeit der Enzymkatalyse zu erklären, stellt das Modell von Kaufmann dar. Kaufmann postuliert, dass die Grenzschicht durch ein eigenes Entropiepotential S beschrieben werden kann. Da die Enzyme Teil der Grenzschicht sind, wird die Reaktionskoordinate eine Variable von S : $S(A, T, \psi, \xi \dots)$. Infolgedessen ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Mikrozustände der adsorbierten Substrat-/Produktmoleküle vollständig vorgegeben. Bringt man das System nun in einen kritischen Zustand, wird das Entropiepotential extrem weit und damit die Fluktuationen zwischen den Mikrozuständen groß. In Analogie zu den mittleren Ortsfluktuationen im Diffusionsfall, nimmt die Rate proportional zu den mittleren quadratischen Fluktuationen von ξ zu (vgl. Fluktuations-Dissipations-Theorem). Die Natur macht sich also tatsächlich die allgegenwärtigen ungeordneten Bewegungen der Enzyme zu Nutze – die Fluktuationen sind die Ursache der Katalyse. Wie die Experimente belegen, gilt dies aufgrund der Kopplung der Fluktuationen über die Maxwell-Relationen auch dann noch, wenn die Enzyme Teil einer größeren Grenzschicht sind. Der physikalische Zustand der Grenzschicht bestimmt somit den biochemischen Vorgang der Katalyse [100]. Folglich besitzt die Physik der Grenzfläche, in der Form des zweiten Hauptsatzes, einen direkten Einfluss auf zelluläre Prozesse und damit das Leben selbst.

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

Im vorherigen Kapitel haben wir gesehen, dass biologische Grenzschichten nicht nur den Ein- und Ausfluss von Ionen zu steuern vermögen, sondern ihnen auch eine regulative Rolle in katalytischen Reaktionen zukommen kann. Diese quasi-statischen Effekte lassen wir jetzt hinter uns und gehen stattdessen auf die dynamischen Eigenschaften von Grenzflächen ein.

Membranen sind ständig Änderungen von Temperatur, Druck, Ionenkonzentration, pH etc. ausgesetzt. So katalysieren beispielsweise viele Enzyme Reaktionen, die während des Substratabbaus Protonen freisetzen. Dadurch kann es zu schnellen lokalen pH-Änderungen kommen. Die Enzymklassen der Lipasen sowie der Esterasen sind die wohl bekanntesten Vertreter hierfür [101, 102]. In diesem Kapitel wird dargelegt, dass eine schnelle lokale Variation einer **beliebigen** thermodynamischen Variablen, wie zum Beispiel pH, zu propagierenden longitudinalen Schallwellen in der Grenzschicht führt. Indes wird sich herausstellen, dass die Schallwellen selbst wiederum alle messbaren Variablen reversibel verändern. So sind die Pulse nicht rein mechanischer Natur, sondern modulieren gleichzeitig das elektrische Oberflächenpotential, sowie den pH-Wert an der Grenzschicht.

Das Kapitel folgt dabei zu großen Teilen der in *Scientific Reports* veröffentlichten Arbeit [103] und ist wie folgt aufgebaut: Es beginnt mit einem kurzen historischen Abriss zur Erforschung von Wellenphänomenen in Lipidmonolagen. Danach wird mit einer theoretischen Beschreibung von Schallwellen in Grenzflächen fortgefahren, woraus sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Ausbreitungsgeschwindigkeit und den Materialeigenschaften ergibt. Anschließend wird experimentell ermittelt, wie Schallwellen in Lipidmonolagen erregt werden können und welche Eigenschaften diese mitbringen. Darauf aufbauend wird abschließend ein neues Modell für inter- und intrazelluläre Signaltransduktion (Signaling) vorgeschlagen.

4.1. Wellenphänomene in Lipidmonolagen

Während die Literatur zu quasi-statischen Filmwaagenexperimenten nahezu unüberschaubar ist, gibt es kaum Publikationen zu dynamischen Effekten. Einer der Ersten, der sich mit Wellen in Lipidmonolagen beschäftigte, war Jacob Lucassen. Im Jahr 1968 veröffentlichte er zwei Arbeiten zu longitudinalen Oberflächenwellen in Grenzschichten. In seiner theoretischen Publikation legt er dar, dass Kapillarwellen unter bestimmten Bedingungen Longitudinalwellen

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

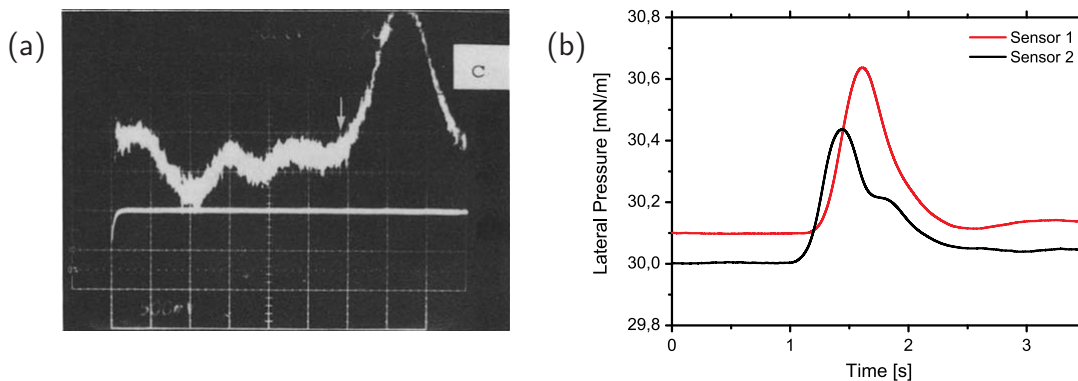


Abbildung 4.1.: Vorhergehende Arbeiten zur Pulsausbreitung in Lipidmonolagen: **(a)** Suzuki et al. lösten mit Licht die Photoisomerisierung von Spiropyran in einer (Lipid-)Monoschicht aus. Der gezeigte Druckpuls von 2 mN/m wurde 16,5 cm entfernt von der Erregungsstelle aufgenommen (Gleichgewichtsdruck 20 mN/m). Die Seitenlänge eines Kästchens in horizontaler Richtung entspricht 20 ms (aus [110]). **(b)** Durch das Aufbringen von Lösungsmitteln auf eine DPPC-Monolage, in diesem Fall Ethanol, konnten Griesbauer et al. ebenfalls Druckpulse erzeugen. Aus der Zeitdifferenz zwischen dem Eintreffen des Pulses an zwei Sensoren im Abstand von 14,5 cm konnte die Ausbreitungsgeschwindigkeit berechnet werden (aus [7]).

an der Oberfläche induzieren können [104]. Um diese nachzuweisen, regt er in seiner gleichzeitig veröffentlichten experimentellen Arbeit mit einer vibrierenden Metallbarriere Wellen auf einer Filmwaage an [105]. Durch die oberflächendruckabhängige Dämpfung der Kapillarwellen konnte er zum ersten Mal die Existenz von longitudinalen Wellen in Lipidmonolagen indirekt nachweisen. Diese zwei Publikationen führten zu einer Kaskade von weitergehenden Arbeiten, die nach wie vor die Kopplung von Longitudinal- und Kapillarwellen ausnutzten, aber auf andere Anregungs- bzw. Detektionsmethoden setzten [106, 107, 108, 109].

1986 konnten Suzuki, Möbius und Ahuja zum ersten Mal longitudinale Wellen in (Lipid-) Monoschichten auslösen, ohne gleichzeitig Kapillarwellen zu erregen [110]. Mittels eines Lichtblitzes isomerisieren sie ein photosensitives Molekül auf der Oberfläche der Filmwaage. Die Isomerisierung verläuft innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums (\sim ms) und führt zu einer „instantanen“ Flächenzunahme der Moleküle und damit zur Ausbreitung von Oberflächendruckpulsen (siehe Abbildung 4.1a). Die Ausbreitungsgeschwindigkeit hängt von den elastischen Eigenschaften der verwendeten Monoschicht ab und liegt zwischen 0,5 und 2,6 m/s.

Im Jahr 2009 gelang es Griesbauer, Wixforth und Schneider zuerst elektrisch und drei Jahre später dann chemisch Schallwellen in Lipidmonolagen anzuregen [6, 7]. Dafür wird ein Lösungsmittel, wie beispielsweise Ethanol, Chloroform oder Pentan, auf eine Lipidmonolage getropft. Dies löst sich in der Monoschicht und ruft gleichsam einen propagierenden Druckpuls

4.2. Theoretische Beschreibung von Schallwellen in Grenzschichten

hervor (siehe Abbildung 4.1b).

In diesem Kapitel wird demonstriert, dass es eine Anregungsform gibt, die wahrscheinlich noch relevanter für biologische Systeme ist: lokale pH-Änderungen. Auch hierzu finden sich in der Literatur bereits Vorarbeiten. Teissié et. al. entdeckten 1985 bei der Zugabe von Säure auf eine Lipidmonolage, dass die Protonendiffusion entlang der Grenzschicht deutlich schneller verläuft als im Bulk [111]. Diese Beobachtung wurde mehrfach bestätigt und wird meist auf die „kristallähnliche“ Struktur des Wassers an der Lipidgrenzschicht, an der sich die Protonen fortbewegen, zurückgeführt [112, 113, 114]. Dieses Phänomen konnte zu einem späteren Zeitpunkt auch an Lipiddoppelschichten nachgewiesen werden [115, 116, 117]. Die beobachteten Diffusionsgeschwindigkeiten schwanken sehr stark zwischen den einzelnen Publikationen, liegen aber typischerweise in der Größenordnung von $1 \cdot 10^{-6}$ bis $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ [111, 115]. Im Vergleich dazu beträgt die Diffusionsgeschwindigkeit der Protonen im Bulk in etwa $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ [118]. Dieses Kapitel offenbart erstmals, dass Protonen nicht nur in der Lage sind präferentiell an Grenzschichten entlang zu diffundieren, sondern auch akustische Pulse in der Grenzschicht auslösen können. Diese sind um Größenordnungen schneller als die angesprochene Diffusion der Protonen und bilden damit eine neue rapide Möglichkeit zur Zellkommunikation. Interessanterweise finden sich in der Biologie unzählige Systeme, wie beispielsweise Pflanzenzellen, Neuronen oder sogar Gele, bei denen eine lokale pH-Änderung zu propagierenden Aktionspotentialen führt [119, 120, 121, 122]. Dies wird derzeit mit sogenannten spannungsgesteuerten Protonenkanalproteinen begründet [123]. Wie wir jedoch sehen werden, reichen Lipidmembranen vollständig aus, um die Erregbarkeit und Propagation von Pulsen zu gewährleisten.

Zur qualitativen und quantitativen Beschreibung der Pulse werden im nächsten Abschnitt die theoretischen Eigenschaften von Schallwellen in Grenzschichten abgeleitet.

4.2. Theoretische Beschreibung von Schallwellen in Grenzschichten

Für die Ableitung der Wellengleichung in zweidimensionalen Grenzschichten folgen wir weitgehend der Arbeit von Landau und Lifshitz [124]. Das dynamische Verhalten von Grenzschichten auf eine Druckänderung wird durch die Kontinuitätsgleichung 4.1 sowie die Euler'sche Gleichung 4.2 beschrieben:

$$\frac{\partial \varrho}{\partial t} + \text{div}(\varrho \vec{v}) = 0 \quad (4.1)$$

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \nabla) \vec{v} = -\frac{1}{\varrho} \nabla \pi \quad (4.2)$$

Die Dichte ϱ und der Lateraldruck π der Monoschicht während einer propagierenden Welle sind gegeben durch:

$$\varrho = \varrho_0 + \varrho' \quad \pi = \pi_0 + \pi' \quad (4.3)$$

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

ϱ_0 und π_0 repräsentieren dabei die Dichte und den Druck der Grenzschicht im Gleichgewicht und ϱ' und π' sind die schwingungsinduzierten Änderungen. Diese sollen deutlich kleiner sein als die Gleichgewichtswerte ($\varrho' \ll \varrho_0$ und $\pi' \ll \pi_0$). Damit folgt für die beiden Gleichungen 4.1 und 4.2 unter Vernachlässigung aller Terme ab der zweiten Ordnung:

$$\frac{\partial \varrho'}{\partial t} + \varrho_0 \operatorname{div} \vec{v} = 0 \quad (4.4)$$

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \frac{1}{\varrho_0} \nabla \pi' = 0 \quad (4.5)$$

Da die Änderungen sehr gering sind, kann ein Zusammenhang zwischen ϱ' und π' hergestellt und somit eine der drei unbekannten Variablen (\vec{v}, π', ϱ') in den beiden Gleichungen eliminiert werden:

$$\pi' = \left(\frac{\partial \pi}{\partial \varrho_0} \right) \varrho' \quad (4.6)$$

Für die Kontinuitätsgleichung ergibt sich:

$$\frac{\partial \pi'}{\partial t} + \varrho_0 \left(\frac{\partial \pi}{\partial \varrho_0} \right)_S \operatorname{div} \vec{v} = 0 \quad (4.7)$$

Demzufolge haben wir zwei Gleichungen für zwei Unbekannte und die Schallwelle ist vollständig bestimmt. Mit dem Geschwindigkeitspotential $\vec{v} = \nabla \phi$ folgt aus Gleichung 4.5:

$$\pi' = -\varrho_0 \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad (4.8)$$

Setzen wir dies in Gleichung 4.7 ein, erhalten wir schließlich die wohlbekannte Wellengleichung:

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - c^2 \Delta \phi = 0 \quad (4.9)$$

$c = \sqrt{\left(\frac{\partial \pi}{\partial \varrho} \right)_S}$ entspricht dabei der Geschwindigkeit der Schallausbreitung. Unter der Annahme, dass der Term $\left(\frac{\partial \pi}{\partial \varrho} \right)_S$ frequenz- und amplitudenunabhängig ist, kann die Geschwindigkeit weiter vereinfacht werden. Seien A und m die Lipidfläche bzw. -masse, so ergibt sich mit $\varrho = \frac{m}{A}$ für c^2 :

$$c^2 = \left(\frac{\partial \pi}{\partial \left(\frac{m}{A} \right)} \right)_S = -\frac{A^2}{m} \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_S = \frac{A}{m \kappa_S} = \frac{1}{\varrho_0 \kappa_S} \quad (4.10)$$

Dabei wird die adiabatische Kompressibilität der Grenzschicht mit κ_S bezeichnet. Folgt die Geschwindigkeit der propagierenden Pulse der Kompressibilität der Monoschicht, handelt es sich demnach um (adiabatische) Schallwellen. Umgekehrt erlaubt die druckabhängige Geschwindigkeitsmessung der Pulse das experimentell schwer zugängliche adiabatische Zustandsdiagramm der Grenzfläche zu bestimmen. Wie wir später sehen werden, gehorchen die

4.3. Aufbau zur Erzeugung und zum Nachweis der Pulse

pH-induzierten Pulse qualitativ dem Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Kompressibilität aus Gleichung 4.10. Quantitativ liegen sie jedoch zwei Größenordnungen unterhalb der erwarteten Werte von etwa 100 m/s. Diese Ungereimtheit konnten Griesbauer et al. ausräumen, indem sie die Kopplung der Monoschicht an die Subphase berücksichtigten. Durch die zusätzliche viskose Kraft in der Euler-Gleichung, ergibt sich letzten Endes eine frequenzabhängige Geschwindigkeit [125]:

$$c = \frac{\omega}{\Re(k)} = \frac{1}{\cos(\frac{\pi}{8})} \sqrt{\frac{1}{\kappa_S} \frac{\sqrt{\omega}}{\eta_w \rho_w}} \quad (4.11)$$

ω entspricht der Wellenfrequenz der Pulse, η_w der Viskosität des Wassers ($\approx 1 \cdot 10^{-3}$ Pa s) und ρ_w der Dichte von Wasser (≈ 1000 kg/m³). Setzt man in diese Formel realistische Werte für ω ein (≈ 5 Hz) und nähert man κ_S mit der isothermen Kompressibilität κ_T , so kommt man auf Ausbreitungsgeschwindigkeiten von ca. 1 m/s, welche in der Tat auch beobachtet werden (siehe experimenteller Teil). Eine detaillierte Herleitung der Relation zwischen der Pulsgeschwindigkeit und der Kompressibilität findet sich in [125]. Wichtiger als die genauen quantitativen Werte ist, für die Charakterisierung der Pulse, der Zusammenhang zu den elastischen Eigenschaften der Grenzschicht (vgl. Gleichung 4.10). Dies stellt ein einfaches Kriterium dar, um zu überprüfen, ob es sich bei den Pulsen um Schallwellen handelt.

Bevor die experimentellen Ergebnissen vorgestellt werden, wird im nächsten Abschnitt die Methodik der durchgeführten Messungen behandelt.

4.3. Aufbau zur Erzeugung und zum Nachweis der Pulse

Der Aufbau für die Erzeugung und die Ausbreitungsmessungen der Pulse ist in Abbildung 4.2 dargestellt. In einem ersten Schritt wird Stickstoff bei bekanntem Druck (normalerweise 0,5 bar) über ein Ventil in ein Gefäß mit einem festen Volumen von 50 ml eingeleitet. Nachdem sich der Druck im Gefäß vollständig an den externen Druck angeglichen hat, wird das Einlassventil geschlossen. Anschließend wird das Auslassventil geöffnet, wodurch das Gas ausströmt und durch die Gasphase einer Flasche gefüllt mit 32%iger Salzsäure geleitet wird. Der Stickstoff „reißt“ dabei einen Teil des gasförmigen HCl's mit und trifft am Rohrende auf die Lipidmonolage. Durch zehn unabhängige pH-Messungen in einem Wassergefäß mit 100 ml Reinstwasser zeigt sich, dass bei einem angelegten Stickstoffdruck von 0,5 bar und einem austretenden Gasvolumen von 50 ml insgesamt $(32,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$ mol Protonen freigesetzt werden. Aus isothermen Messungen ist bereits bekannt, dass eine pH-Erniedrigung in der Subphase zur Kondensation von Lipidmonolagen führt [126]. Demzufolge protoniert das austretende Gas die negativ geladenen Lipidkopfgruppen und kondensiert die Lipidschicht an der Anregungsstelle. Aufgrund der Massenerhaltung führt dies in der Folge zu einer propagierenden Expansionsfront. Um die Universalität der Erregung zu demonstrieren, kann die

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

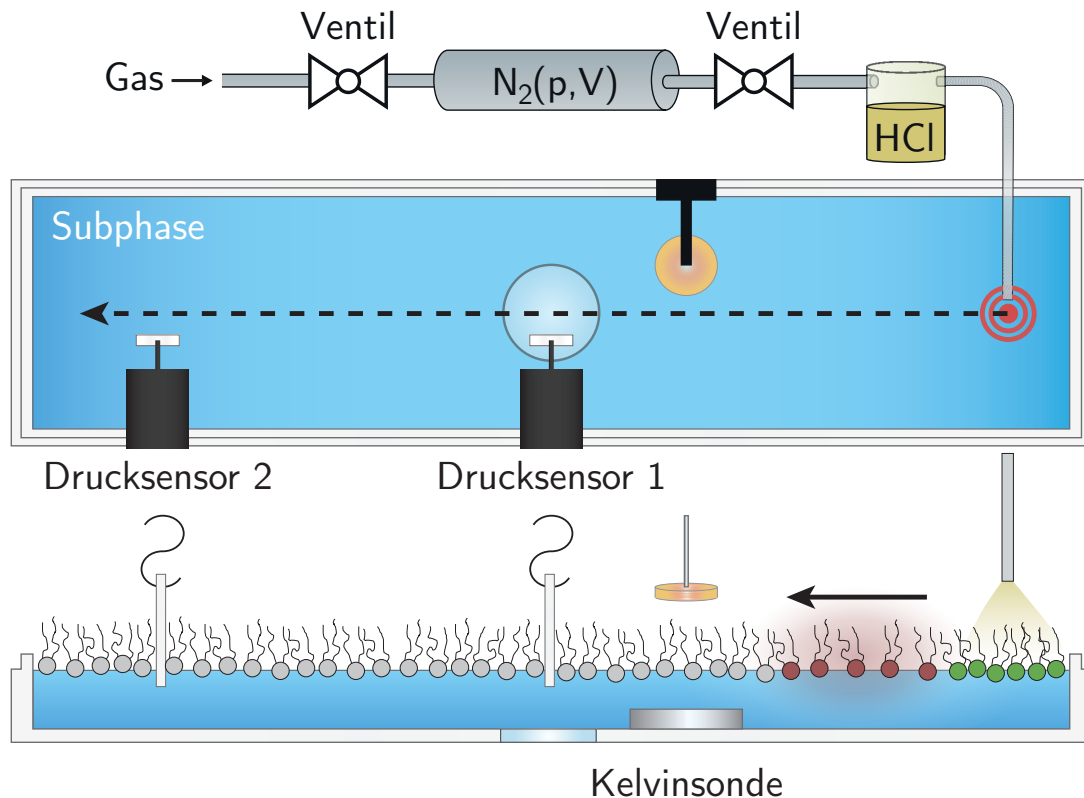


Abbildung 4.2.: Filmwaagensetup zur Pulserzeugung und Propagationsmessung: Eine feste Menge N_2 wird durch die Gasphase einer 32%igen HCl Lösung geleitet und strömt anschließend über der Lipidmonoschicht aus. Dort protoniert das Gasgemisch die negativ geladenen Lipide, was zu einer lokalen Kondensation führt. Dies ist in der Abbildung durch die grünen Kopfgruppen der Lipide dargestellt. Aufgrund der Massenerhaltung kommt es simultan zu einer sich ausbreitenden Expansionsfront, die mit den rot gefärbten Lipiden illustriert wird. Die Propagation der Pulse wird mittels zwei Drucksensoren sowie einer Kelvinsonde aufgezeichnet. Aus Gründen der Anschaulichkeit befinden sich die Kelvinsonde und der Drucksensor 1 in dieser Abbildung nebeneinander. Im experimentellen Aufbau sind die beiden aber direkt gegenüber voneinander positioniert. Für Fluoreszenzmessungen wird die Kelvinsonde durch einen optischen Aufbau ersetzt (nicht gezeigt). Dadurch können Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und deren Emission zeitabhängig aufgenommen werden.

4.4. pH-Anregung von Grenzflächen

verwendete Brønsted-Säure sowie das Trägergas ausgetauscht werden. In weiteren Experimenten werden beispielsweise Essigsäure oder Salpetersäure eingesetzt. Die gasförmige Anregung birgt den Vorteil, dass im Gegensatz zur Titration, simultan eine große Fläche protoniert werden kann, bei zugleich deutlich geringerem Materialeinsatz. Darüber hinaus entstehen durch den kleinen externen Druck keine Kapillarwellen bei der Anregung.

Die Anregungsstelle befindet sich 10 cm vom ersten Drucksensor sowie der Kelvinsonde entfernt. In Abbildung 4.2 wurden, aus Gründen der Anschaulichkeit, die beiden Sensoren nebeneinander, anstatt gegenüber voneinander positioniert. Der zweite Drucksensor ist in einem Abstand von 15 cm nach den ersten beiden Sensoren angebracht. Das Ausgangssignal der Sensoren wird mit einem selbstgebauten Verstärker um den Faktor zehn verstärkt und mit einem AD-Wandler ausgelesen. Dadurch erhöht sich die Genauigkeit der Druckmessung auf 0,1 mN/m und der Oberflächenpotentialmessung auf 5 mV. Außerdem kann das Signal mit 10 000 samples/s aufgezeichnet werden und damit tausend mal schneller als mit dem Standard-NIMA-Setup. Erst diese schnelle Ausleserate ermöglicht eine genaue Geschwindigkeitsbestimmung der Pulse. Um Fluoreszenzmessungen durchzuführen, wird die Kelvinsonde durch einen optischen Aufbau ersetzt (nicht gezeigt). Hiermit können fluoreszierende Farbstoffe angeregt und deren Emission zeitaufgelöst vermessen werden. Um Diffusions- und Konvektionseffekte auszuschließen, wird für die optischen Experimente ein zusätzlicher Teflonring um den Messbereich gelegt (nicht dargestellt). Der Ring hat einen Durchmesser von 4 cm und eine Öffnung von 1 cm auf der Anregung entgegengesetzten Seite. Damit mögliche Messartefakte durch die Anregung ausgeschlossen werden können, werden Referenzmessungen mit dem reinen Trägergas sowie einer reinen Wasseroberfläche durchgeführt (siehe Anhang A.4). Das Trägergas N_2 zeigt weder einen Einfluss auf das reine Wasser noch auf eine DMPS-Monolage. Auch bei Hinzunahme von HCl und CH_3COOH ist kein Effekt auf die Oberflächenspannung der reinen Wasseroberfläche nachweisbar. Nach dem Ausschluss möglicher Artefakte, kann jetzt der Einfluss der Säureanregung auf Lipidmonolagen untersucht werden.

4.4. pH-Anregung von Grenzflächen

In Abbildung 4.3a ist eine typische Druckantwort einer DMPS-Monolage auf eine lokale pH-Erniedrigung durch das HCl/ N_2 -Gemisch zu sehen (Anregung mit 0,1 bar). Die pH-Anregung kondensiert die Lipidmonolage an der Anregungsstelle, was zu einem lokalen Druckabfall führt. Aufgrund der Massenerhaltung induziert dies einen propagierenden Expansionspuls. Zuerst erreicht dieser Druckpuls den Drucksensor 1 und führt dort zu einem reversiblen Druckabfall von ca. 2,0 mN/m. 0,25 s später erreicht der Puls den zweiten Drucksensor, wenngleich mit gedämpfter Amplitude ($\sim 55\% A_0$). Aus der Zeitdifferenz zwischen der Ankunft des Pulses an den beiden Sensoren sowie dem bekannten Abstand von 0,15 m kann eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von 0,6 m/s errechnet werden. Als Vergleich dazu lässt sich aus der maxima-

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

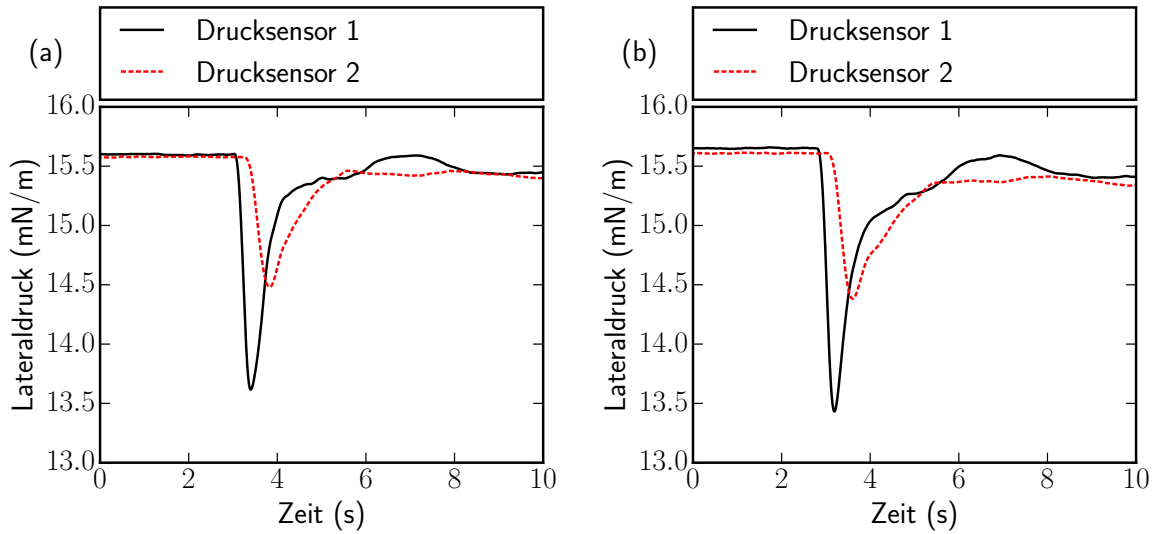


Abbildung 4.3.: pH-induzierte Pulsausbreitung in einer DMPS-Monolage: **(a)** Anregung mit Salzsäure: Durch das HCl kondensiert lokal die Monolage, was zu einem propagierenden reversiblen Druckabfall führt. Über die makroskopische Distanz von 0,15 m wird der Puls zwischen den beiden Drucksensoren um 55 % abgedämpft. Aus der unterschiedlichen Ankunftszeit an den Sensoren kann eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von 0,6 m/s berechnet werden. **(b)** Anregung mit Essigsäure: Der Verlauf der beiden Drucksignale ist fast identisch zu den HCl-induzierten Pulsen. Da die dissoziierten Protonen die einzige Gemeinsamkeit zwischen den beiden Säuren darstellen, schließen wir, dass die Pulse durch die Protonierung der negativ geladenen Lipidkopfgruppen ausgelöst werden (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7, 20 °C).

len Diffusionskonstante der Protonen ($2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$) und der „charakteristischen Länge“ von 0,15 m die „Ausbreitungsgeschwindigkeit“ der Protonen im Diffusionsfall abschätzen: $v = 1,3 \cdot 10^{-6} \text{ m/s}$. Die akustischen Pulse sind also mindestens 500 000 mal schneller.

Die Frage ist nun, ob dieser Effekt nur spezifisch für die HCl-Anregung auftritt, oder auch mit anderen Säuren beobachtet werden kann. Um dem auf den Grund zu gehen, wird die 32%ige Salzsäure durch eine 100%ige Essigsäure ersetzt. Abbildung 4.3b zeigt das Verhalten der DMPS-Grenzschicht nach einer Essigsäureanregung. Die Druckkurven gleichen weitgehend dem Verlauf der HCl-induzierten Pulse. Die Zeitdifferenz des Pulses zwischen den beiden Drucksensoren bleibt gleich und somit auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit. Die Amplitude befindet sich ebenfalls in der selben Größenordnung wie zuvor und dies obwohl HCl eine deutlich stärkere Säure darstellt [127]. Dieses Verhalten liegt vermutlich daran, dass entweder deutlich mehr CH_3COOH -Moleküle vom Trägergas mitgerissen werden oder aber vorrangig die dissoziierten Protonen vom Gas wegtransportiert werden.

Dass tatsächlich die Protonen für die Erregung der Grenzschicht sorgen, lässt sich an

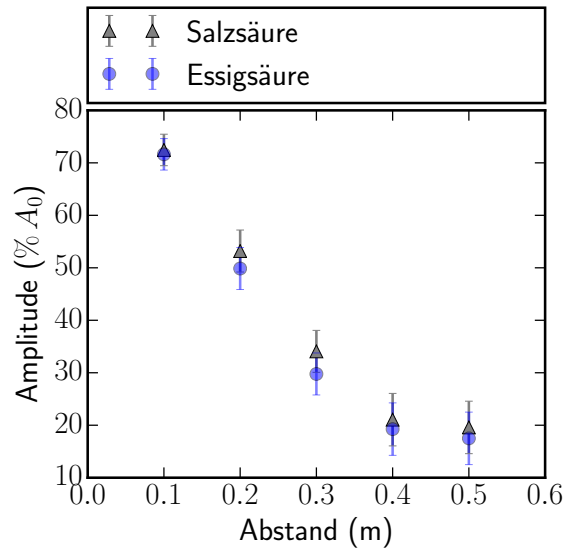


Abbildung 4.4.: Dämpfung Salz- und Essigsäure-induzierter Pulse: Beide Anregungsarten führen mit größer werdendem Abstand zu einer exponentiell abfallenden Pulsamplitude. Im Rahmen der Messgenauigkeit zeigen die Amplituden ein gleichförmiges Abklingverhalten. Dies unterstreicht die Annahme, dass die ausgelösten Pulse identisch sind (fünf unabhängige Messungen pro Messpunkt).

der Druckantwort der Lipidmonolage erkennen. Würden sich die beiden Säuren in die Monolage einbauen, so wäre ein Druckanstieg anstatt eines Druckabfalls zu erwarten [6]. Daher verbleiben nur die dissoziierten Protonen der beiden Säuren als Erklärungsansatz. Diese protonieren die negativ geladenen Lipidköpfe und verringern dadurch den Lateraldruck, den die Schicht auf die Filmwaage ausübt. Molekular kann dieser Vorgang auf die Abnahme der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Lipiden zurückgeführt werden [128]. Experimente mit Salpetersäure bzw. Schwefelsäure untermauern den vorgeschlagenen Mechanismus der Protonierung (nicht gezeigt). Wie wir später sehen werden, reicht sogar Kohlenstoffdioxid aus, um Pulse in Lipidmonolagen hervorzurufen. CO_2 reagiert in Kontakt mit Wasser im geringen Maße zu Kohlensäure und kann daher ebenfalls die hydrophilen Kopfgruppen protonieren.

Einen weiteren wichtigen Punkt, der über den gemeinsamen Anregungsmechanismus hinausgeht, illustriert das Dämpfungsverhalten der HCl - und CH_3COOH -induzierten Pulse. In Abbildung 4.4 ist die Wellenamplitude der „ HCl -“ bzw. „ CH_3COOH -Pulse“ in Abhängigkeit vom Abstand zur Anregungsstelle dargestellt. Die Amplitude nimmt in beiden Fällen exponentiell ab und die Werte stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit miteinander überein. Der gemeinsame Anregungsmechanismus führt also folgerichtig auch zu identischen Pulsen. Typische Größenordnungen von Zellen liegen meist im μm -Bereich und sind somit deutlich kleiner als die hier betrachteten Längenskalen [10]. In diesen Systemen wäre die Dämpfung der pH-induzierten Wellen praktisch vernachlässigbar.

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzsichten

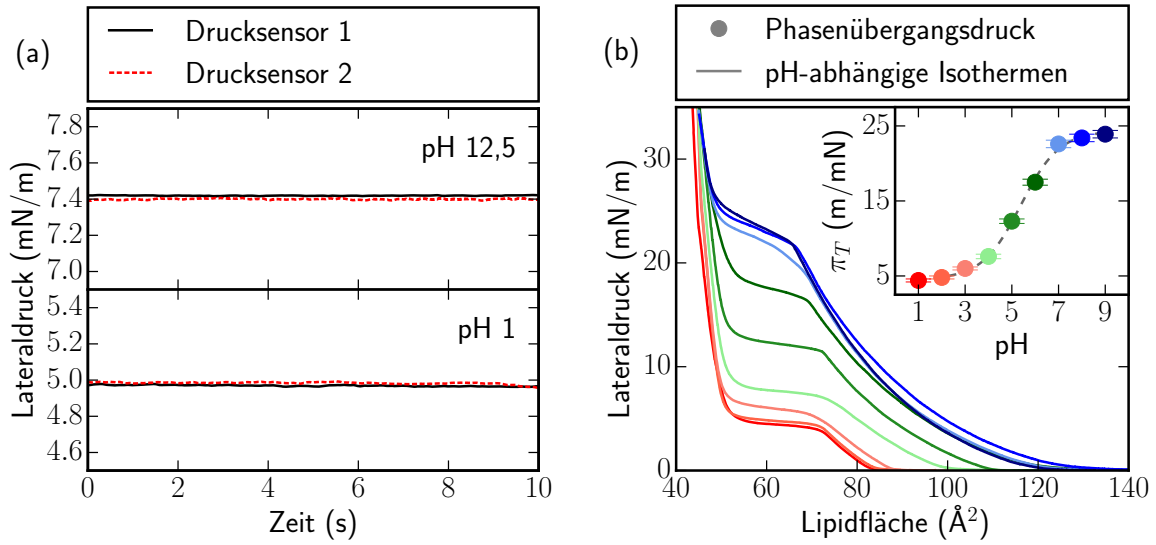


Abbildung 4.5.: pH-Abhängigkeit der pH-Anregung: **(a)** Bei hohen, respektive niedrigen pH-Werten (12,5 und 1) lassen sich keine Pulse in einer DMPS-Monolage erzeugen (Anregung nach 3 s). Dieses Verhalten lässt sich verstehen, wenn man die quasi-statische pH-Abhängigkeit der Grenzsicht betrachtet: **(b)** Eine pH-Erniedrigung verschiebt den Phasenübergang zu immer kleineren Lateraldrücken (siehe Inset). Besonders stark ist dieser Effekt zwischen pH 7 und 4 ausgeprägt, während das Verhalten im Basischen und Sauren sättigt. Der sigmoidale Verlauf entspricht der Protonierung der negativ geladenen Carboxylgruppe. Der pK_S -Wert liegt in dieser Messung bei 5,4 – in sehr guter Übereinstimmung mit anderen Publikationen [128] (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C).

Die Tatsache, dass die verschiedenen Säuren zu ähnlichen Pulsen und einem gleichförmigen Dämpfungsverhalten führen, deutet stark auf einen protonischen Anregungsursprung hin. Demzufolge müsste die Anregung aber auch stark pH-abhängig verlaufen. Diese Vorhersage wird im nächsten Abschnitt verifiziert.

4.4.1. pH-abhängige Anregung von Pulsen

Abbildung 4.5a zeigt den Versuch mit HCl Pulse in einer DMPS-Monolage bei den extremen pH-Werten 1 und 12,5 in der Subphase auszulösen. Offensichtlich gelingt dies im Gegensatz zu pH 7 (Abbildung 4.3a) in keinem der Fälle. D.h. die Anregung hängt wesentlich vom lokalen pH-Wert an der Grenzsicht ab. Um diesen Effekt zu verstehen, betrachten wir das quasi-statische Verhalten einer DMPS-Monolage bei variierenden pH-Werten (siehe Abbildung 4.5b). Bei abnehmenden pH-Werten verschiebt sich der Phasenübergang der Grenzsicht hin zu kleineren Lateraldrücken. Besonders stark fällt die Verschiebung des horizontalen Plateaus zwischen pH 4 und 7 aus. Oberhalb wie unterhalb dieses Bereichs ändert eine pH-Erhöhung bzw. eine pH-Erniedrigung kaum etwas am Phasenübergangsdruck. Dem-

4.4. pH-Anregung von Grenzflächen

zufolge stabilisiert ein saures Milieu die flüssig-kondensierte Phase, während ein basisches Milieu die flüssig-expandierte Phase festigt. Trägt man den Übergangsdruck gegen den pH der Subphase auf, so ergibt sich ein sigmoidaler Verlauf (siehe Inset in Abb. 4.5b). Dieses Verhalten steht im Einklang mit der Protonierung einer Säuregruppe. Der Wendepunkt des Graphen entspricht dem pK_S -Wert der Carboxylgruppe der Lipidkopfgruppe. Der ermittelte Wert von 5,4 stimmt hierbei hervorragend mit Literaturdaten überein [128].

Mit diesen Erkenntnissen lässt sich die pH-Abhängigkeit der Anregung leicht erklären: Bei niedrigen pH-Werten (< 3) sind die Carboxylgruppen der Lipidköpfe bereits fast vollständig protoniert. Deshalb führt eine pH-Erniedrigung durch die Säure zu keiner weiteren Protonierung der Lipide und induziert somit auch keine Pulse. Zudem beginnt die Protonierung der geladenen Phosphatgruppe von DMPS (vgl. Abb. 2.2) erst bei pH-Werten unterhalb von 0,5 und spielt somit im betrachteten Bereich keine Rolle [128, 129]. Bei hohen pH-Werten (> 8) liegt die Carboxylgruppe dagegen weitgehend ionisiert vor. In diesem Fall muss die Anregung den pH-Wert an der Grenzschicht auf unter 7 absenken, da erst ab diesem Zeitpunkt eine merkliche Protonierung der Carboxylgruppe stattfindet (vgl. Inset in Abbildung 4.5b). Tritt dies nicht ein, können ebenfalls keine Pulse hervorgerufen werden.

Aufgrund der beobachteten pH-Abhängigkeit, kann die Pulserregung eindeutig auf die Protonierung der Lipidkopfgruppen zurückgeführt werden. Je nach Lipid erfolgt die Protonierung dementsprechend in deutlich unterschiedlichen pH-Bereichen. Somit verfügen biologische Membranen über einen einfachen Kontrollmechanismus, der je nach lokaler Zusammensetzung der Membran, Pulserregung ermöglicht oder verhindert.

Mit der Anregung zweier weiterer sehr unterschiedlicher Lipidmonolagen (DPPG und DPPC) wird die Universalität des Effekts deutlich (siehe Abb. 4.6). DPPG ist bei neutralem pH einfach negativ geladen ($pK_S = 3,1$ [18]), während DPPC ungeladen vorliegt ($pK_S \approx 1$ [18]) (Strukturaufbau siehe Abbildung 2.2). Demnach erfordert die Protonierung von DPPC sehr viel extremere Bedingungen als DPPG (in diesem Fall einen Subphasen-pH-Wert von 1). Nach der Protonierung von dessen Phosphatgruppe liegt das Lipid einfach positiv geladen vor. Überraschenderweise führt dies trotzdem zu einer lokalen Kondensation und damit zu einer propagierenden Expansionsfront. Dies ist mit der räumlichen Orientierung der Cholingruppe zu erklären. Im ungeladenen Fall liegt diese parallel zur Wasseroberfläche. Wird die Phosphatgruppe protoniert, richtet sich die Cholingruppe senkrecht auf, wodurch eine höhere Packungsdichte der Monolage ermöglicht wird [130].

Zusammenfassend konnte mittels der Verwendung von verschiedenen Brønsted-Säuren belegt werden, dass eine Protonierung der hydrophilen Kopfgruppen Pulse in Lipidmonolagen induziert. Ob die Grenzschicht erregbar ist, hängt dabei entscheidend vom pK_S -Wert des jeweiligen Lipids sowie der Stärke der lokalen pH-Änderung ab. Der gemeinsame Anregungsmechanismus führt unabhängig von der verwendeten Säure zu identischen Pulsen. Die erzeugten Wellen in DMPS-, DPPG- und DPPC-Monoschichten illustrieren die Universalität

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzsichten

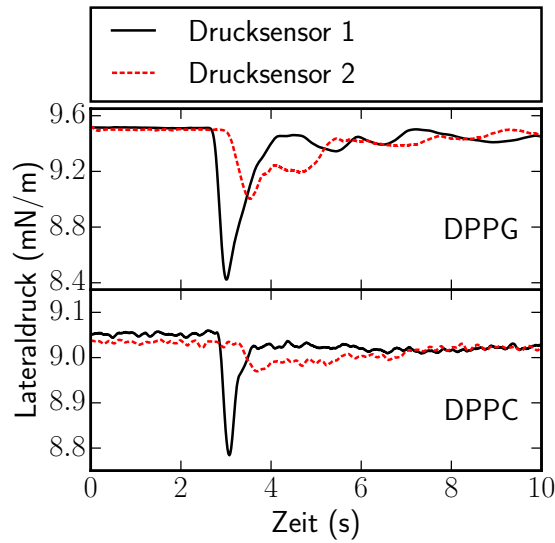


Abbildung 4.6.: Anregung von Pulsen in verschiedenen Lipidmonolagen: Bei pH 7 liegt DPPG einfach negativ geladen vor. Da dessen pK_S -Wert etwas niedriger liegt als von DMPS ($\approx 3,1$ [18]), resultiert die Anregung bei pH 7 in einer geringeren Pulsamplitude (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7, 20 °C, 0,1 bar HCl-Anregung). DPPC liegt im Neutralen dagegen ungeladen vor und benötigt aufgrund des sehr niedrigen pK_S -Werts der Phosphatgruppe (ca. 1) [18] ein extrem saures Milieu, um überhaupt anregbar zu sein (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 1, 20 °C, 0,1 bar HCl-Anregung).

dieses Vorgangs. Nachdem der Anregungsmechanismus auf die Protonen zurückgeführt werden konnte, werden im nächsten Abschnitt die Pulse selbst näher charakterisiert.

4.4.2. Einfluss der Anregungsstärke auf die Pulsform

Wird der Anregungsdruck erniedrigt, nimmt die Anzahl der ausströmenden Protonen immer mehr ab. Dies äußert sich in einer kleiner werdenden Halbwertsbreite der Pulse (siehe Abbildung 4.7a). Bei sehr niedrigen Drücken ($< 0,02$ bar) beträgt die Halbwertsbreite der Pulse nur noch ca. 100 ms (nicht gezeigt). Infolge des großen Gasgefäßes, des großen Leervolumens der Zuleitungen sowie der Ungenauigkeit des Barometers bei niedrigen Drücken, wird bei dem verwendeten Aufbau jedoch stets ein Mindestvolumen an Gas freigesetzt. Deshalb kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es eine minimale Halbwertsbreite der Pulse gibt. Prinzipiell sollten aber bei einer geringeren Systemgröße noch deutlich „schmalere“ Pulse realisierbar sein.

Neben der Pulsbreite fällt als zweiter Punkt die Biphasigkeit des Drucksignals auf. Nach der Expansionsfront springt der Druck kurzzeitig über seinen Gleichgewichtswert hinaus. Dies spiegelt den erwarteten Verlauf einer adiabatischen Störung wider. Aufgrund der Massenerhal-

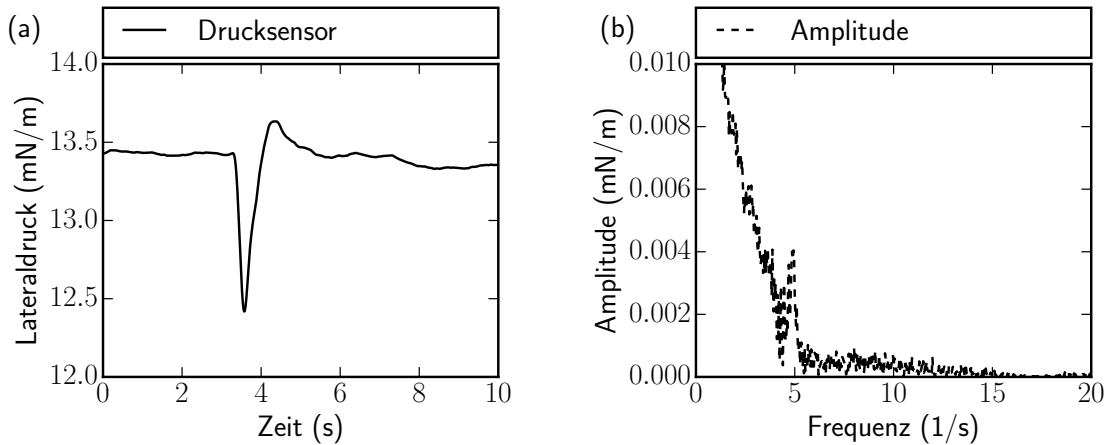


Abbildung 4.7.: Anregungsabhängigkeit der Pulsform: **(a)** Bei kleinen Anregungsdrücken treten weniger Protonen aus, wodurch die Halbwertsbreite der Pulse abnimmt. Zugleich wird die biphasische Antwort des Systems auf die Punktstörung sichtbar. **(b)** Das zugehörige Fourierspektrum offenbart die verschiedenen Frequenzanteile des Pulses. Neben starken niederfrequenten Beiträgen weist der Puls ein weiteres Maximum bei ca. 5 Hz auf. Höherfrequente Anteile können praktisch vernachlässigt werden (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7, 20 °C, 0,05 bar HCl-Anregung).

tung müssen sich bei Schallwellen Orte höherer Dichte immer durch Orte niedrigerer Dichte ausgleichen. Bei einem zweidimensionalen System führt dies, wie Horace Lamb bereits 1906 in seinem berühmten Buch „Hydrodynamics“ zeigen konnte, zu einer biphasischen Systemantwort [131].

Das zugehörige Fourierspektrum des Pulses ist in Abbildung 4.7b dargestellt. Es besteht zum Großteil aus niederfrequenten Anteilen (< 4 Hz). Bei 5 Hz zeigt sich ein weiteres Maximum, das auf den steilen Druckabfall zurückgeführt werden kann. Damit treten bei den pH-induzierten Pulsen deutlich höherfrequente Anteile auf, als im Fall einer Tröpfchenanregung mit Lösungsmitteln (vgl. [45]). Dies beruht auf dem unterschiedlichen Anregungsmechanismus. Da die Gasanregung simultan den Zustand eines nicht unerheblichen Teilbereichs der Lipidmonolage modifiziert, ist die resultierende Änderung pro Zeiteinheit auch deutlich größer als bei der Tröpfchenanregung. Folglich ist das zugehörige Frequenzspektrum nach oben verschoben.

Größere Mengen an freigesetztem Gas führen in Übereinstimmung mit der vorausgehenden Betrachtung zu deutlich längeren Halbwertsbreiten (siehe Anhang A.5). Die Relaxation des Druckabfalls ist dann durch die Diffusion der Protonen sowie die Pufferkonzentration im Bulk bestimmt. Solange der lokale pH an der Oberfläche nicht sein vorheriges Niveau erreicht, bleiben die Lipide teilweise protoniert und der Druck verharrt unterhalb seines Gleichgewichtswertes. Die Pulsausbreitung verläuft dann zwar immer noch adiabatisch, aber die Relaxation der Grenzschicht ist an den langsamen Deprotonierungsvorgang der Lipidköpfe geknüpft.

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

Zeitlich noch ausgedehntere Pulse lassen sich mit einer reinen Kohlenstoffdioxidanregung realisieren (siehe Anhang A.5). CO_2 reagiert in Kontakt mit Wasser zu einem geringen Prozentsatz von etwa 0,7 % weiter zu Kohlensäure [127]. Innerhalb des pH-Bereichs der Experimente ($\sim 6\text{--}8$) liegt die Kohlensäure fast nur in einfach dissoziierter Form vor. Die zweite Dissoziationsstufe spielt dagegen praktisch keine Rolle [132]:



Die Umwandlung von CO_2 verläuft sehr langsam, was dazu führt, dass Pulse nur bei (Phosphat-)Pufferkonzentrationen $< 3\text{ mM}$ ausgelöst werden können. Ansonsten werden die freiwerdenden Protonen sofort von den Puffermolekülen aufgenommen. In allen nachfolgenden Experimenten mit CO_2 wird daher eine Phosphatpufferkonzentration von 1 mM verwendet. In diesem Fall bewirkt die CO_2 -Anregung Pulse mit sehr langen Relaxationszeiten. Während die Grenzschicht bereits relaxiert, werden an der Anregungsstelle immer noch Protonen frei (vgl. Anhang A.5). Fittet man eine Funktion an den exponentiell verlaufenden Druckanstieg zurück ins Gleichgewicht, ergibt sich eine Umwandlungsrate von $k \approx (0,038 \pm 0,005)\text{ s}^{-1}$. Dieser Wert stimmt sehr gut mit anderen Publikationen überein ($k \approx 0,037\text{ s}^{-1}$) [132, 133]. Wie wir später sehen werden, erleichtert diese große Zeitspanne die Untersuchung von Puls-Protein-Wechselwirkungen. Außerdem bietet die Pulsanregung mittels CO_2 den Vorteil, dass das gelöste CO_2 nach und nach wieder in die Atmosphäre übergeht und der pH-Wert der Subphase auch nach vielen Anregungen konstant bleibt.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde stets eine lokale pH-Erniedrigung zur Anregung von Pulsen in Lipidmonolagen eingesetzt. Im nächsten Abschnitt wollen wir nachweisen, dass auch Änderungen anderer Variablen zu Pulsen in der Grenzschicht führen.

4.5. Temperaturanregung von Grenzflächen

Neben dem pH-Wert stellt die Temperatur eine weitere gängige Möglichkeit dar, um den Zustand von Lipidmonolagen zu beeinflussen. Eine Temperaturerhöhung führt zur Expansion der Grenzschicht, während eine Temperaturerniedrigung die Lipide kondensiert [44, 54]. Die Erregung von Pulsen bedingt folglich, in Analogie zu den pH-induzierten Pulsen, eine starke lokale Temperaturänderung. Um dies zu erreichen, wird Flüssigstickstoff verwendet ($T = 77\text{ K}$). Dieser wird mit einer Pipette aufgenommen und ein Tropfen von ca. $10\text{ }\mu\text{l}$ auf die DMPS-Monolage abgelegt. Wie in Abbildung 4.8 zu sehen ist, führt die lokale thermische Kondensation der Monoschicht zu einem propagierenden (Expansions-)Puls. Die Relaxationszeit der Grenzschicht ist deutlich länger als bei der pH-Anregung. Dies liegt einerseits daran, dass sich der siedende Stickstofftropfen wie ein Luftkissenboot auf der Oberfläche fortbewegt und daher längere Zeit auf der Lipidmonolage verbleibt. Andererseits benötigt das System deutlich länger, um die starke lokale Temperaturänderung zu kompensieren und geht daher

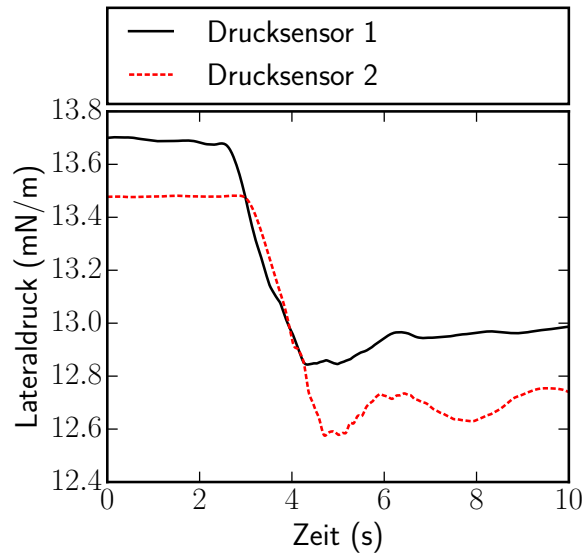


Abbildung 4.8.: Anregung einer DMPS-Monolage durch eine lokale Temperaturerniedrigung: Das Aufbringen von ca. 10 μ l Flüssigstickstoff auf eine DMPS-Monolage führt zu einer lokalen Kondensation der Lipide und folglich zu einer propagierenden Expansionsfront, wie wir sie bereits für pH-induzierte Pulse beobachten konnten. Dies unterstreicht die Universalität des Vorgangs: Sobald eine thermodynamische Variable des Systems ausreichend stark verändert wird, führt dies unweigerlich zu einer Pulsausbreitung (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 20 °C).

nur sehr langsam wieder in den Gleichgewichtszustand über. Die Geschwindigkeit der Pulse von ca. 0,5 m/s liegt in der selben Größenordnung, wie die der pH-induzierten Pulse. Dies ist ein Indiz dafür, dass allein die elastischen Eigenschaften der Grenzfläche die Ausbreitungsgeschwindigkeit bestimmen.

Aufgrund der signifikant höheren Reproduzierbarkeit der pH-induzierten Pulse werden wir in den folgenden Abschnitten zu dieser Anregungsmethode zurückkehren. Nichtsdestotrotz verdeutlicht die Temperaturanregung, dass prinzipiell alle Variablen der Grenzschicht Pulse auslösen können. Als weiteres mögliches Beispiel hierfür sind zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} zu nennen, die für ihren starken Einfluss auf den Zustand von Lipidschichten bekannt sind [134, 135].

Im nächsten Abschnitt wird untersucht, wie die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Pulse mit den elastischen Eigenschaften der Grenzschicht zusammenhängt.

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

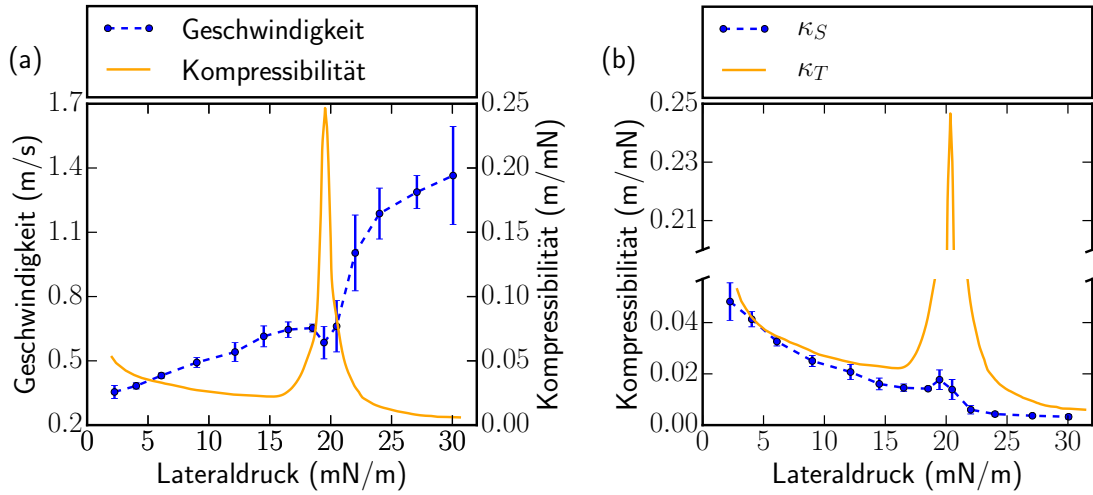


Abbildung 4.9.: Zustandsabhängige Ausbreitungsgeschwindigkeit: **(a)** Die Geschwindigkeit der Pulse zeigt eine klare Abhängigkeit vom Zustand der Grenzschicht. Die maximale isotherme Kompressibilität κ_T illustriert den Phasenübergang der Monoschicht. Dort wird die Grenzschicht sehr weich und die Geschwindigkeit der Pulse weist ein lokales Minimum auf. Daraus kann gefolgert werden, dass die Pulse akustischer Natur sind („Schallwellen“) (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, 0,1 bar HCl-Anregung). **(b)** Mittels Gleichung 4.11 kann aus der Ausbreitungsgeschwindigkeit die adiabatische Kompressibilität κ_S der Grenzschicht berechnet werden (Annahme $\omega \approx 2\pi \cdot 5 \text{ s}^{-1}$). Diese zeigt qualitativ einen gleichförmigen Verlauf wie κ_T , nimmt aber, wie theoretisch zu erwarten, beständig niedrigere Werte an.

4.6. Zustandsabhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit

Aus der Zeitdifferenz der Pulse zwischen den beiden Drucksensoren und deren bekanntem Abstand kann die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Pulse ermittelt werden. In Kapitel 3 wurde deutlich, wie stark der Phasenzustand der Grenzschicht Enzyme beeinflussen kann. Deshalb stellt sich die Frage, ob die Pulse ebenfalls davon beeinflusst werden. Dafür werden bei verschiedenen Lateraldrücken Pulse in einer DMPS-Monolage angeregt. Der Mittelwert der Pulsgeschwindigkeit und die zugehörige Standardabweichung aus fünf unabhängigen Messungen sind in Abb. 4.9a aufgetragen. Mit zunehmendem Lateraldruck und damit größer werden der Oberflächendichte der Lipide steigt die Geschwindigkeit, wie zu erwarten, an. Nur in einem kleinen Bereich von 18–20 mN/m weicht die Kurve von ihrem monoton ansteigenden Profil ab und weist ein lokales Minimum auf. An der isothermen Kompressibilität lässt sich sehr gut erkennen, dass dieses Minimum genau in den Phasenübergangsbereich der DMPS-Monolage fällt. Die Geschwindigkeit der Pulse ist also durch die elastischen Eigenschaften der Grenzschicht vorgegeben. Laut Gleichung 4.10 handelt es sich deshalb um ein akustisches Wellenphänomen. In diesem Fall kommt es in erster Näherung zu keinem Wärmeaustausch

mit der Umgebung und die Entropie des Systems bleibt erhalten (vgl. Gleichung 2.3).

Aus der zustandsabhängigen Geschwindigkeit der Pulse kann auf die ansonsten schwer bestimmbare adiabatische Kompressibilität κ_S der Schicht geschlossen werden (vgl. Gleichung 4.11). In Abb. 4.9b ist sie zusammen mit der isothermen Kompressibilität κ_T aufgetragen. Beide zeigen einen qualitativ ähnlichen Verlauf, mit einem Maximum im Phasenübergang der Grenzschicht. Wie theoretisch zu erwarten, liegt κ_S stets unterhalb von κ_T [124]. Allerdings kann nicht kontrolliert werden, ob die Grenzschicht bei den isothermen und den dynamischen Experimenten gleich groß ist. D. h. es besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich die dynamische Pulsausbreitung auf eine sehr dünne Schicht konzentriert, während bei den quasi-statischen Versuchen eine größere Anzahl an gebundenen Wassermolekülen zur Kompressibilität beiträgt. Dies würde eine „weichere“ Grenzschicht nach sich ziehen, wie wir es in der Tat beobachten.

Als nächstes wird das Kollisionsverhalten der akustischen Pulse analysiert. Daraus lassen sich weitere Charakteristika der Pulse extrahieren.

4.7. Kollidierende Pulse

Aus dem Verhalten der Pulse während einer Kollision können wichtige Folgerungen gezogen werden: Überlagern sich die Pulse, so handelt es sich wahrscheinlich um lineare Pulse. Durchdringen sich die Pulse dagegen oder löschen sie sich gar aus, so handelt es sich um sogenannte solitäre Pulse [136]. Seit einigen Jahren häufen sich die Indizien dafür, dass solitären Wellen auch in biologischen Systemen eine wichtige Rolle zukommt [137]. Ein aktuell kontrovers diskutiertes Thema stellen beispielsweise solitäre Wellen als Modell für den Nervenimpuls dar [138, 139, 140, 141]. Die Form von solitären Pulsen bleibt während der Propagation erhalten. Grund hierfür ist eine Nichtlinearität im System, wie z. B. ein Phasenübergang, die exakt die Dispersion und damit das „Auseinanderlaufen“ des Wellenpaketes ausgleicht.

Um die Kollision von pH-induzierten Pulse zu beobachten, lösen wir gleichzeitig zwei Pulse an beiden Enden der Filmwaage aus. Dafür wird das Gas mit einem T-Stück aufgetrennt und in einem Abstand von jeweils 20 cm zur Mitte auf die Monoschicht geleitet. Das resultierende Druck- bzw. Kollisionssignal in der Filmwaagenmitte wird aufgezeichnet und mit einer einseitigen Erregung verglichen. Dies ist in den Abbildungen 4.10a und 4.10b anhand von Pulsen in der flüssig-expandierten Phase und im Phasenübergang einer DMPS-Monolage dargestellt. Auffallend ist, dass die Drucksignale bei „einseitiger Anregung“ einen sehr ähnlichen Verlauf zeigen wie die Kollisionskurven. Die Reflexion der Pulse an der Filmwaagenwand führt jeweils zu einem zeitlich ondulierten Lateraldruck. Multipliziert man die Druckänderung der einseitigen Anregung mit dem Faktor zwei und gleicht die Baseline der Kurven an, ergibt sich das erwartete Kollisionssignal im Fall einer linearen Überlagerung der Pulse („berechnete Kollision“). Wie eindeutig zu erkennen ist, stimmen die berechneten Druckabfälle sehr gut

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzsichten

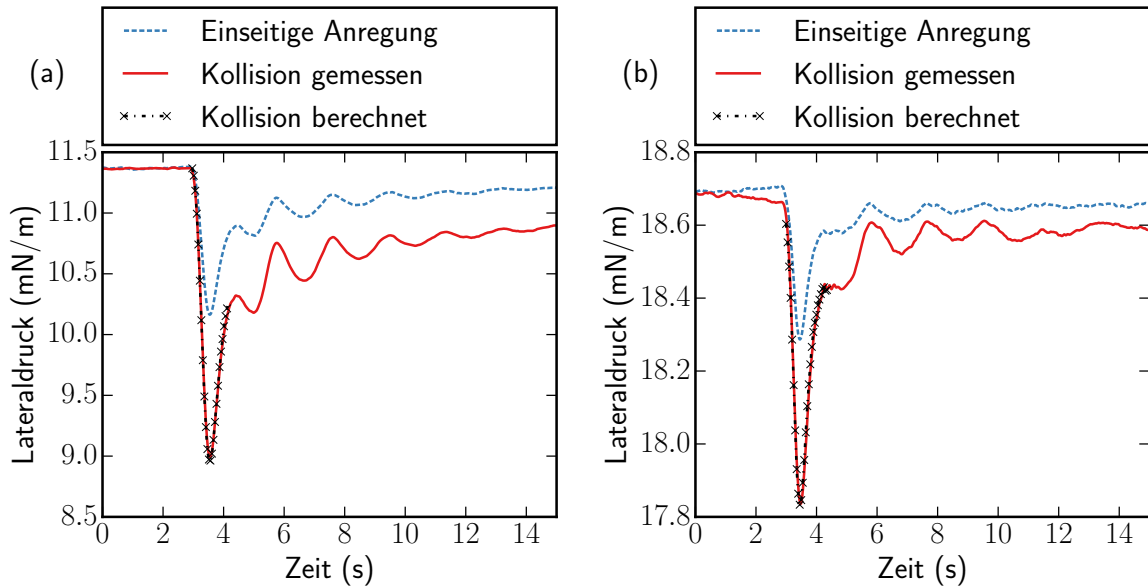


Abbildung 4.10.: Kollision von Pulsen in einer DMPS-Monolage: Durch die arithmetische Verdopplung der Druckänderung der „einseitigen Anregung,“ erhält man das erwartete Drucksignal im Fall einer linearen Überlagerung zweier kollidierender Pulse („Kollision berechnet“). Diese Kurve stimmt hervorragend mit der gemessenen Puls-kollision überein. Abbildungen (a) (flüssig-expandierte Phase) und (b) (Phasenübergang) demonstrieren weiterhin die Unabhängigkeit dieses Effekts vom Phasenzustand der Monolage. Folglich handelt es sich bei den pH-induzierten Pulsen um lineare Wellenpakete (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,6, 20 °C, 0,5 bar HCl-Anregung).

mit den gemessenen Drucksignalen während der Kollision überein. Bei den pH-induzierten Pulsen handelt es sich folglich um lineare Pulse. Wie Abb. 4.10a und 4.10b beweisen, gilt dies unabhängig vom Phasenzustand der Grenzsicht. Eine weitere Abbildung zur Kollision der Pulse im flüssig-kondensierten Bereich befindet sich in Anhang A.6. Des Weiteren ist dort zu sehen, dass sich die kollidierenden Pulse bei anderen pH-Werten in der Subphase ebenfalls linear überlagern und der beobachtete Effekt somit pH-unabhängig ist.

Für reale Systeme folgt aus dieser Linearität, dass sich Pulse, die an verschiedenen Orten in der Grenzsicht ausgelöst werden, lokal verstärken können. In dem hypothetischen Fall, dass Proteine ebenfalls eine Anregungsschwelle besäßen, könnten Pulseffekte somit räumlich eingegrenzt werden. Außerdem ist zu erwarten, dass die linearen Pulse bei genügend starker Anregung in einen nichtlinearen Bereich übergehen und somit auch ein nichtlineares Kollisionsverhalten aufweisen (Auslöschung, Durchdringung ...).

Nachdem wir uns bisher intensiv mit der mechanischen Beschaffenheit der Pulse auseinandergesetzt haben, wollen wir jetzt untersuchen, ob und wie sich die Pulse auf den biochemisch sehr relevanten pH-Wert an der Grenzfläche und das lokale elektrische Feld auswirken.

4.8. Chemische Eigenschaften der Pulse

Abschnitt 4.4.1 dokumentiert, dass lokale pH-Änderungen an Lipidmonolagen propagierende Druckänderungen $\left. \frac{\partial \pi}{\partial pH} \right|_S$ hervorrufen. Daher ergibt sich die Frage, ob die Umkehrung davon ebenfalls richtig ist: Induzieren propagierende (Druck-)Pulse pH-Änderungen $\left. \frac{\partial pH}{\partial \pi} \right|_S$ an der Grenzschicht?

Um eine Antwort darauf zu finden, wird ein Fluoreszenz-gelabeltes Lipid verwendet (Oregon Green 488 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine [OG]). Fluoreszenz-gelabelte Lipide werden vielfach für pH-Wert Messungen an Grenzflächen eingesetzt, da ihr Emissionsspektrum sehr sensitiv auf Änderungen der lokalen Protonenkonzentration reagiert [142]. Dies gilt im besonderen Maße in der Nähe des pK_S -Wertes der Farbstoffe [143]. Meist wird zur Bestimmung des lokalen pH-Werts die Emission der Farbstoffmoleküle bei einer festen Wellenlänge aufgezeichnet. Das zieht aber Messungenauigkeiten nach sich, da der Farbstoff nach und nach ausbleicht (Photobleaching) und die Absolutwerte der emittierten Intensität verfälscht. Deshalb wird in dieser Arbeit die Fluoreszenz des Farbstoffs bei den zwei unterschiedlichen Wellenlängen 535 nm und 605 nm gemessen. Das Verhältnis der beiden Intensitäten $I_V = \frac{I_{535 \text{ nm}}}{I_{605 \text{ nm}}}$ entspricht dem „Fingerabdruck“ des Emissionsspektrums und macht Absolutwerte überflüssig [144].

Um festzustellen, welchen Einfluss der Lateraldruck der Monoschicht sowie der pH-Wert in der Subphase auf I_V besitzen, werden pH-abhängig Isothermen einer DMPS-Monoschicht mit 1 mol % OG aufgenommen (siehe Abb. 4.11a). Es zeigt sich, dass I_V im Bereich zwischen 5–8 mN/m quasi unabhängig vom Lateraldruck ist. Neben dem Lateraldruck ändert sich bei den Messungen natürlich gleichzeitig auch das Oberflächenpotential (vgl. Abbildung 2.8). Folglich kann dessen Einfluss auf I_V im betrachteten Bereich ebenfalls vernachlässigt werden. Die Unabhängigkeit von I_V vom Lateraldruck und vom Oberflächenpotential gilt über einen deutlich weiteren Bereich hinweg als hier dargestellt. Da die später gezeigten Pulse aber zwischen 5 und 8 mN/m liegen, wurden der Anschaulichkeit halber die gezeigten isothermen Kurven ebenfalls auf diesen Ausschnitt beschränkt. Die Originalkurve über den gesamten Messbereich befindet sich in Anhang A.7.

Im Gegensatz zu Lateraldruck und Oberflächenpotential reagiert I_V sehr stark auf pH-Änderungen in der Subphase. Bei einer pH-Erhöhung von 6,5 auf 7,5 nimmt I_V quasi linear von $2,0 \pm 0,1$ auf $2,6 \pm 0,1$ zu (siehe Abb. 4.11a). Folglich kann OG als lokaler pH-Sensor an der Grenzschicht fungieren und eventuelle pulsinduzierten pH-Änderungen abbilden. Es ist wichtig anzumerken, dass das Verhalten dieses Farbstoffs nicht einfach verallgemeinert werden kann. Vielmehr ist es allein die spezifische Phänomenologie von OG, die es erlaubt I_V als „Antenne für die lokale Protonenkonzentration“ zu interpretieren. Ohne sorgfältige Kalibrierung können Intensitätsänderungen im Allgemeinen nicht einfach mit dem Grenzflächen-pH in Verbindung gebracht werden.

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzsichten

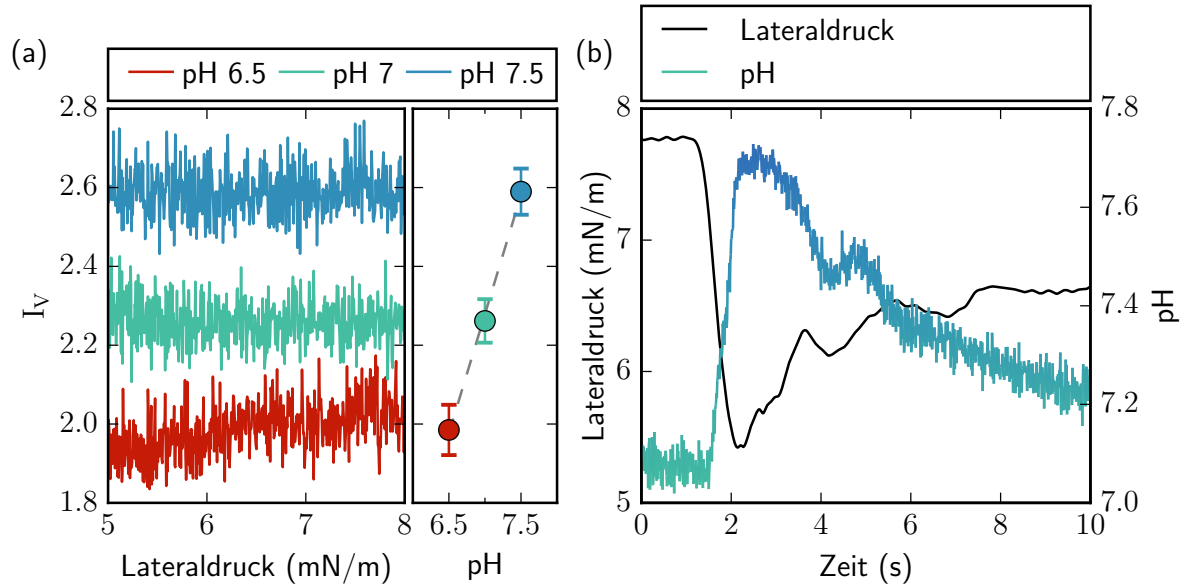


Abbildung 4.11.: Pulsinduzierte pH-Änderungen an der Grenzschicht: **(a)** Zur lokalen pH-Messung an der Lipidmonolage wird ein Fluoreszenz-gelabeltes Lipid verwendet. Das Messsignal I_V hängt bei isothermen Messungen praktisch nur vom pH-Wert in der Subphase ab. Die beiden Größen zeigen einen linearen Zusammenhang. Änderungen des Lateraldrucks (und damit auch des Oberflächenpotentials) haben dagegen im gezeigten Bereich einen vernachlässigbaren Einfluss auf I_V . Mit Hilfe des linearen Zusammenhangs zwischen I_V und pH kann der lokale pH-Wert an der Grenzschicht während eines propagierenden Pulses untersucht werden: **(b)** Die durch den Puls herbeigeführten Druck- und pH-Änderungen korrelieren eindeutig miteinander. Während der Druck um 2,4 mN/m absinkt, steigt der pH am Farbstoff gleichzeitig von ca. 7,1 auf 7,7 an. Demzufolge reagiert der pH der Grenzschicht deutlich unterschiedlich auf adiabatische und isotherme Zustandsänderungen (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 20 °C, 0,5 bar HCl-Anregung).

Abbildung 4.11b zeigt den zeitlichen Verlauf des pH-Werts am Farbstoff während eines propagierenden Pulses. Offensichtlich korrelieren Lateraldruck und lokaler pH-Wert bei dieser adiabatischen Zustandsänderung invers miteinander. Basierend auf der phänomenologischen quasi-statischen Kopplung aus Abb. 4.11a folgt, dass sich der pH-Wert der Grenzschicht während eines Pulses um etwa $\Delta\text{pH} = 0,6\text{--}0,7$ erhöht. Anschließend relaxieren sowohl der Lateraldruck als auch der Grenzflächen-pH zurück auf ihre vorherigen Gleichgewichtswerte. In Analogie zur Protonenzugabe, die eine lokale Kondensation der Lipidmonolage bewirkt, führt eine Expansion der Grenzschicht zur Freisetzung gebundener Protonen und erhöht folglich den lokalen pH. Dieser Effekt ist bereits von statischen Experimenten in ungepufferten Lipidlösungen bekannt [145, 126]. Die Ursache hierfür liegt in der geringeren Oberflächenladungsdichte während der Expansion. In der Folge nimmt daher einerseits die lokale Protonenkonzentration ab und andererseits verschiebt sich gleichzeitig der pK_S -Wert der Lipide zu niedrigeren Werten [17]. D.h. die Affinität der Schicht für Protonen wird weiter reduziert, was die Deprotonierung der Grenzschicht noch verstärkt. Die negative Korrelation zwischen Druck- und pH-Änderung ist folglich der Tatsache geschuldet, dass die lokale pH-Anregung der Schicht zu einer propagierenden Expansionsfront führt. Vergleicht man diese Experimente mit den quasi-statischen Messungen, so zeigt sich, dass adiabatische Vorgänge in gepufferten Systemen zu einem qualitativ unterschiedlichen Verhalten der Grenzschicht führen: Während im isothermen Fall der lokale pH-Wert an der Monolage konstant bleibt (vgl. Abbildung 4.11a), nimmt er bei der adiabatischen Pulsausbreitung kurzzeitig zu (vgl. Abbildung 4.11b). Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Zeitskalen der Prozesse zurückzuführen. Im isothermen Fall können freiwerdende Protonen von den Puffermolekülen aufgenommen werden und die Grenzschicht steht jederzeit mit der Subphase im Gleichgewicht. Bei den Pulsen hingegen, werden in kurzer Zeit so viele Protonen freigesetzt, dass die lokale pH-Änderung nicht abgepuffert werden kann und sich der pH an der Grenzschicht signifikant erhöht. Eine Pufferkonzentration von 10 mM in der Subphase bedeutet circa ein freies Puffermolekül in einem Würfelvolumen mit der Seitenlänge 25 nm. An der Grenzschicht kann im Gegensatz dazu nach jedem Nanometer ein Proton gebunden bzw. freigesetzt werden. Daran sieht man bereits, dass biologische Membranen als ein gigantisches Protonenreservoir dienen. Eine Möglichkeit, um mehr über die molekularen Prozesse an der Grenzschicht sowie die zugrundeliegenden Zeitskalen herauszufinden, stellt die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie dar. Diese erlaubt es hochauflösende zeitliche Messungen von Einzelmolekülen durchzuführen und könnte daher zukünftig dazu beitragen, die beobachtete Diskrepanz zwischen dem isothermen und dem adiabatischen Verhalten aufzulösen.

Von den chemischen Eigenschaften der Pulse spannen wir jetzt einen Bogen zum elektrischen Potential der Lipidmonolage. Die in Phase propagierenden Änderungen von pH und Druck legen nahe, dass das Oberflächenpotential während der Pulse gleichfalls variieren wird. Diese Vorhersage wird im nächsten Abschnitt überprüft.

4.9. Elektrische Eigenschaften der Pulse

Wie schon für die lokalen pH-Änderungen wollen wir die elektrischen Eigenschaften der Grenzschicht zuerst im isothermen Fall diskutieren, um daraus dann Vorhersagen für deren adiabatisches Verhalten abzuleiten. Aufgrund der gleichzeitigen Änderung von Druck, Fläche und pH während eines Pulses ergeben sich mehrere Beiträge, die das Oberflächenpotential V^{tot} beeinflussen. Eine erste quantitative Abschätzung der adiabatischen Zustandsänderung kann mit Hilfe der Isothermen erreicht werden. In Abschnitt 2.5.3 wurde demonstriert, dass das Oberflächenpotential und der Lateraldruck bei isothermer Kompression bzw. Expansion einen sehr ähnlichen Verlauf aufweisen (vgl. Abbildung 2.8). Die horizontalen Bereiche im Phasenübergang der Monoschicht implizieren eine enorme Zunahme der Flächen- und Ladungsfluktuationen. Außerhalb dieses Bereichs steigen sowohl der Lateraldruck als auch das Oberflächenpotential mit zunehmender Flächendichte monoton an. Folglich wird für einen propagierenden „Druckabfall“ eine sich simultan ausbreitende Abnahme des Oberflächenpotentials erwartet. Diese Abnahme kann abgeschätzt werden, indem man aus Abbildung 2.8 die Funktion $V^{tot}(\pi)$ extrahiert (siehe Abb. 4.12a). Damit kann für eine gegebene Druckänderung $\Delta\pi$ die zu erwartende Oberflächenpotentialänderung ΔV^{tot} im isothermen Fall bestimmt und mit der adiabatischen Systemantwort verglichen werden.

In Abbildung 4.12b sind der Lateraldruck und das Oberflächenpotential während eines Pulses gezeigt. Das gemessene Oberflächenpotential (Oberflächenpotential exp) und das errechnete Oberflächenpotential (Oberflächenpotential cal) verlaufen beide sehr ähnlich, wobei die gemessene Oberflächenpotentialänderung etwas größer ausfällt, als die berechnete ($\sim 30\%$). Dieses Phänomen trat bei allen Messungen auf und ist vermutlich auf das unterschiedliche Verhalten des Systems im adiabatischen Fall zurückzuführen (siehe spätere Diskussion). Bei stärkeren Anregungen konnten Pulse mit Amplituden von > 100 mV beobachtet werden (siehe Anhang A.8). Dies liegt in der Größenordnung von biologischen Aktionspotentialen und sollte in der angesprochenen kontroversen Diskussion um den zugrundeliegenden Mechanismus der Nervenreizleitung berücksichtigt werden [138, 139].

Elektrische und chemische Änderungen an der Grenzfläche sind eng miteinander verknüpft. Um den lokalen pH-Wert aus den Oberflächenpotentialdaten abzuschätzen, folgen wir den Arbeiten von Möbius [55, 108, 110]. Dieser unterteilt das gesamte Oberflächenpotential V^{tot} in zwei Anteile [55]: Aufgrund der negativen Ladungen der Kopfgruppen sowie der ionischen Doppelschicht, kommt es an der Grenzfläche zu einem Potentialsprung $\psi < 0$, der mit der Gouy-Chapman-Theorie berechnet werden kann (siehe Abschnitt 2.4). Des Weiteren gibt es noch einen zweiten Beitrag $V^{CH_3} > 0$, der das Dipolmoment der Lipidketten umfasst und hauptsächlich durch die terminale CH_3 -Gruppe entsteht [146]: $V^{tot} = \psi + V^{CH_3}$. Erstaunlicherweise besitzt das Dipolmoment der hydrophoben Ketten/Luft-Grenzfläche einen vernachlässigbaren Einfluss auf den pK_S -Wert der Kopfgruppe. Dies belegen unter anderem Möbius Experimente mit verschiedenen langen Fettsäureketten [55] bzw. der Vergleich der pK_S -

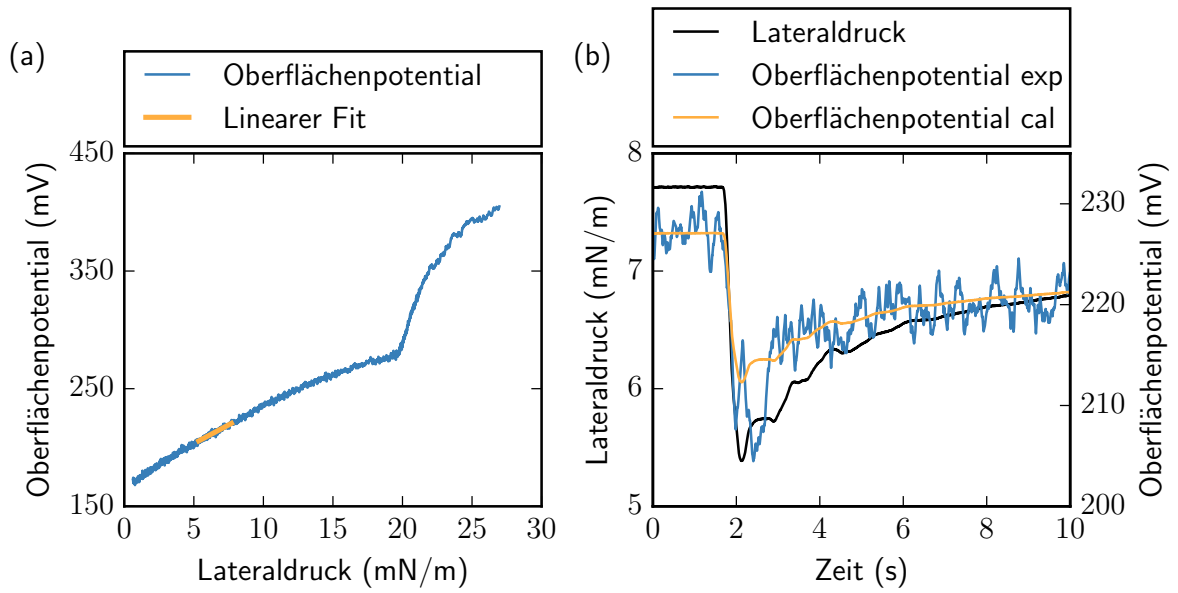


Abbildung 4.12.: Elektrische Eigenschaften einer DMPS-Monolage: **(a)** Durch die Verknüpfung von Oberflächenpotential und Lateraldruck kann aus Abb. 2.8 die Funktion $V^{tot}(\pi)$ extrahiert werden. Damit lässt sich die Oberflächenpotentialänderung für eine gegebene Druckvariation $\Delta\pi$ abschätzen (linearer Fit). Das errechnete Signal (Oberflächenpotential cal) für einen Druckpuls von $-2,5$ mN/m ist in **(b)** gegen das tatsächliche Messsignal (Oberflächenpotential exp) aufgetragen. Beide zeigen einen gleichförmigen Verlauf und stimmen quantitativ bis auf eine Differenz von ca. 30 % überein (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 20 °C, 0,5 bar HCl-Anregung).

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

Werte von DMPS-Monolagen (5,4) (vgl. Abbildung 4.5b) mit DMPS-Vesikeln (5,5) [128]. Obwohl sich die Grenzflächenpotentiale von Monolagen und Vesikeln deutlich voneinander unterscheiden, gleicht sich der pK_S -Wert der Lipide in beiden Fällen sehr. Das bedeutet, dass die Protonierung der Kopfgruppe der Lipide fast ausschließlich durch das Kopfgruppenpotential ψ bestimmt ist. Dadurch kann die nachfolgende Diskussion auf zwei Fragen beschränkt werden: Wie verändert sich ψ während eines Pulses und welchen Einfluss besitzt dies auf den Grenzflächen-pH?

Aus dem sigmoidalen Fit von Abbildung 4.5b kann abgeschätzt werden, dass bei pH 7 ca. 88 % der Carboxylgruppen ionisiert vorliegen. Nimmt man die isotherme Flächenänderung als Maßstab für die adiabatische Änderung während eines Pulses, so ergibt sich aus Abbildung 2.8 und Abbildung 4.12b: $A_1 = 75 \text{ \AA}^2$ ($\pi_1 = 7,7 \text{ mN/m}$) $\rightarrow A_2 = 82 \text{ \AA}^2$ ($\pi_2 = 5,3 \text{ mN/m}$). Damit lässt sich mit der Gouy-Chapman-Theorie die Potentialänderung $\Delta\psi$ abschätzen (vgl. Gleichung 2.27):

$$\Delta\psi = \psi_2(A_2) - \psi_1(A_1) = -113 \text{ mV} + 117 \text{ mV} = 4 \text{ mV}$$

ψ nimmt während des Pulses also um etwa 4 mV zu. Demzufolge verringert sich die Oberflächenladungsdichte, d. h. die Oberfläche ist weniger negativ als zuvor, was zu einer Freisetzung von an der Grenzschicht gebundenen Protonen führt [126]. Die Validität der berechneten Potentialwerte kann experimentell überprüft werden. Dazu werden Oberflächenpotentialkurven bei verschiedenen Subphasen pH-Werten aufgezeichnet (siehe Abbildung 4.13). Bei einem pH von 1,5 sind die Carboxylgruppen vollständig protoniert, während sie bei pH 9 komplett ionisiert vorliegen. Der Beitrag der Schwanzgruppen zum Oberflächenpotential ist für eine feste Fläche (hier $A = 75 \text{ \AA}^2$) näherungsweise konstant. Demnach ist die Oberflächenpotentialdifferenz der Kurven bei dieser Fläche allein auf die Änderung des Kopfgruppenpotentials zurückzuführen:

$$\Delta V^{tot} = V_{9,0}^{tot} - V_{1,5}^{tot} = (V^{CH_3} - \psi)_{9,0} - (V^{CH_3} - \psi)_{1,5} = \psi_{9,0} - \psi_{1,5} = \psi_{\Delta} \quad (4.13)$$

Die Deprotonierung führt zu einer Änderung von $\psi_{\Delta} \approx -180 \text{ mV}$. Bei pH 7 sind, wie bereits angesprochen, 88 % der Carboxylgruppen ionisiert. Daher ergibt sich: $\psi_{\Delta}^{0,88} = -158 \text{ mV}$, in guter Übereinstimmung mit der Gouy-Chapman-Theorie. Um daraus den Grenzflächen-pH quantitativ abzuschätzen, kann die Boltzmann-Verteilung verwendet werden [46]. Die Protonenkonzentration an der Grenzfläche $[H_G^+]$ ist dabei über den Boltzmann-Faktor $\exp(-\frac{e\psi}{k_B T})$ mit der Protonenkonzentration im Bulk $[H_B^+]$ verbunden (vgl. Gleichung 2.19):

$$[H_G^+] = [H_B^+] \exp\left(-\frac{e\psi}{k_B T}\right) \quad (4.14)$$

Für eine Oberflächenpotentialänderung von $\psi_1(A_1) = -117 \text{ mV}$ nach $\psi_2(A_2) = -113 \text{ mV}$ ergibt Gleichung 4.14: $\Delta pH_G = 0,1$. Dies spiegelt qualitativ den richtigen Trend wider (der

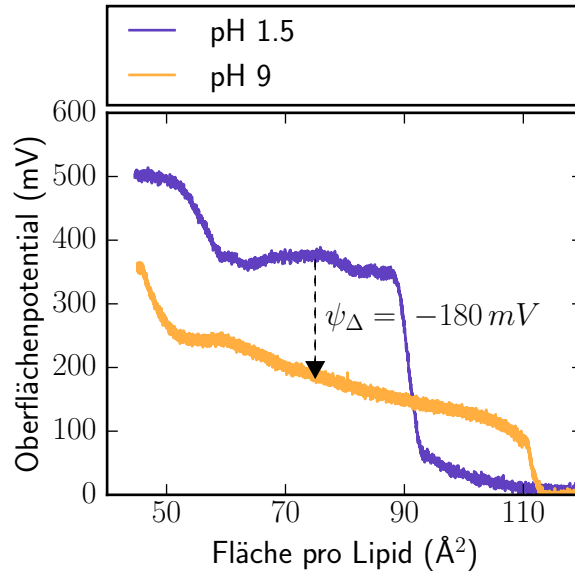


Abbildung 4.13.: Einfluss des Subphasen pH-Werts auf das Oberflächenpotential einer DMPS-Monolage: Eine pH-Änderung von 1,5 auf 9,0 verschiebt nicht nur den Phasenübergangsdruck der Lipidmonolage (vgl. Abbildung 4.5b), sondern erniedrigt gleichzeitig auch das Oberflächenpotential. Bei einer festen Fläche ist der Beitrag der Lipidketten zum Oberflächenpotential näherungsweise konstant. Deshalb kann die Änderung des Potentials auf die (De-)Protonierung der Kopfgruppen zurückgeführt werden. Bei $A = 75 \text{ Å}^2$: $\psi_{\Delta} = -180 \text{ mV}$ (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C).

Grenzflächen-pH nimmt zu), liegt quantitativ aber unter dem gemessenen Wert von $\Delta\text{pH}_G \approx 0,6$. Der Ursprung dieser Abweichung ist noch nicht vollständig geklärt. Aus theoretischer Sicht sind jedoch von vornherein Unterschiede zwischen dem adiabatischen und isothermen Verhalten des Systems zu erwarten [38]. Darüber hinaus wird in der Berechnung die Abnahme des pK_S -Wertes der Carboxylgruppen durch die Expansion der Schicht vernachlässigt [145]. Die pK_S -Verschiebung erniedrigt die Affinität der Grenzfläche für Protonen weiter und sollte so verstärkend auf die lokale pH-Zunahme wirken [17]. Zusätzlich könnte auch die propagierende elektrische Feldänderung die Emission des Farbstoffes im adiabatischen Fall beeinflussen.

Zusammenfassend führen die Ergebnisse der Oberflächenpotential- und Fluoreszenzmessungen zu einem konsistenten Bild: Der Grenzflächen-pH nimmt während der Pulsausbreitung zu. Die Abnahme der Oberflächenladungsdichte und die damit einhergehende Verschiebung des pK_S -Wertes der Carboxylgruppe führen zu einer Reduzierung der Protonenkonzentration an der Grenzschicht. Der Unterschied zwischen den adiabatischen und isothermen Experimenten verwundert insofern nicht, als dass dieser Effekt selbst bei extrem einfachen Systemen den Normalfall darstellt. Zum Beispiel variiert beim „idealen Gas“ die mechanische Antwort des Systems, je nachdem ob die Zustandsänderung adiabatisch oder isotherm herbeigeführt wird

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzsichten

($\kappa_T \neq \kappa_S$) [38]. Da mechanische, elektrische und chemische Eigenschaften der Grenzschicht gekoppelt sind, ist es schlüssig, dass sich das Grenzflächenpotential sowie der Grenzflächen-pH bei einer adiabatischen Zustandsänderung ebenfalls anders verhalten werden als bei isothermen Messungen. Um quantitativ genauere Vorhersagen über die pulsinduzierten Änderungen treffen zu können, müssten die adiabatischen Zustandsdiagramme der Systeme vorliegen. Es wurde bisher aber noch keine experimentelle Möglichkeit gefunden, um diese zu bestimmen.

Zum Abschluss dieses Kapitels werden die gewonnenen Erkenntnisse über die Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzsichten zusammengefasst und darauf aufbauend eine neue Theorie der Zellkommunikation vorgeschlagen.

4.10. Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurde zum ersten Mal gezeigt, dass durch eine schnelle Änderung des lokalen Grenzflächen-pH-Werts bzw. der lokalen Temperatur Pulse in Lipidmonolagen erregt werden können. Dies deutet daraufhin, dass prinzipiell **jede** thermodynamische Variable der Grenzschicht dazu im Stande ist. Anhand der pH-Anregung wurde nachgewiesen, dass die linearen Wellenpakete nur innerhalb eines begrenzten pH-Bereichs ausgelöst werden können. Der Bereich ist durch den Protonierungsübergang (pK_S -Wert) der Lipidkopfgruppen vorgegeben. Aus drei Gründen dürfte insbesondere die pH-Anregung eine Rolle in biologischen Systemen spielen:

1. Es gibt, wie bereits angesprochen, viele Enzyme, die während der Katalyse Protonen freisetzen.
2. Aufgrund ihrer geringen Größe ist die Diffusionsgeschwindigkeit von Protonen im Vergleich zu anderen Ionen stark erhöht.
3. Die geringe räumliche Ausdehnung der Protonen führt gleichzeitig dazu, dass sie deutlich näher an die Lipidköpfe herankommen und sich daher besonders stark auf die Grenzschicht auswirken [126].

Vorhergehende Arbeiten griffen zur Anregung von longitudinalen Wellen im Gegensatz dazu auf eine optisch getriggerte Konformationsumwandlung [110], das Auftropfen von Lösungsmitteln [7] sowie eine vibrierende Rasierklinge zurück [139].

Bei der pH-Anregung führt die Zugabe von Protonen zu einer lokalen Kondensation der Grenzschicht, was aufgrund der Massenerhaltung eine Expansionsfront hervorruft. Die Geschwindigkeit der Pulse wird durch die elastischen Eigenschaften der Grenzschicht kontrolliert und liegt in der Größenordnung von ca. 1 m/s. Damit sind die Pulse mindestens 500 000 mal schneller als die Diffusion der Protonen. Zusätzlich findet bei den akustischen Wellenpaketen im Gegensatz zur Diffusion kein Materialtransport statt.

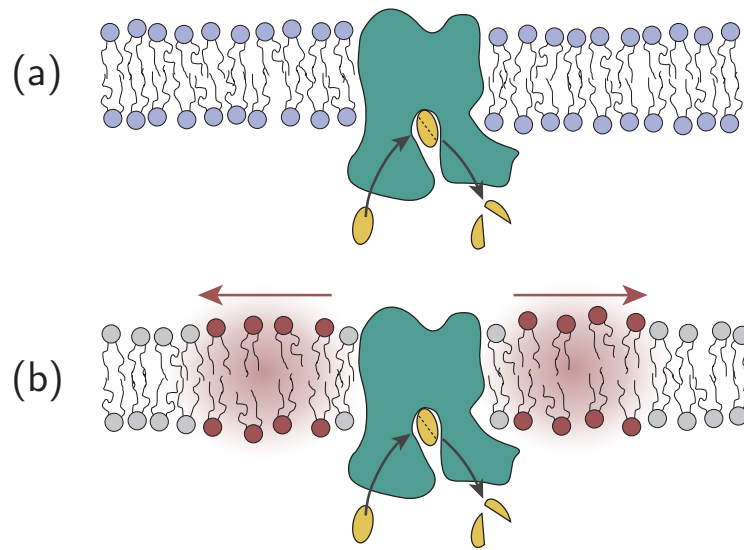


Abbildung 4.14.: Spezifische Erregung einer Lipiddoppelschicht: Ein Enzym setzt durch den Abbau eines Substrats lokal Protonen frei. Liegt der pK_S -Wert der angrenzenden Lipide weit entfernt vom lokalen pH und/oder ist die Anregungsstärke zu gering, so wird kein Puls in der Schicht ausgelöst (Fall **(a)**). Ist die Anregung hingegen groß genug um die Protonierung der Lipidkopfguppen zu verändern, kommt es zu propagierenden Pulsen in der Grenzschicht (Fall **(b)**).

Die Pulse induzieren jedoch nicht nur lokale Druckänderungen, sondern beeinflussen gleichzeitig **alle** messbaren Observablen der Grenzschicht. In dieser Arbeit wurden hierbei das Oberflächenpotential und der lokale pH-Wert an der Monolage detailliert untersucht. Während der Expansionsphase des Pulses kommt es zu einer Abnahme des lokalen Oberflächenpotentials, bei zugleich zunehmendem Grenzflächen-pH-Wert. Die mechanischen, elektrischen und chemischen Eigenschaften der Pulse koppeln **in Phase** miteinander. Es ist wichtig anzumerken, dass die Erregung und Propagation der mechano-elektro-chemischen Pulse auf rein physikalischen Vorgängen basiert. Unter der Voraussetzung einer ausreichend großen lokalen „Störung“ ist zu erwarten, dass dieses Phänomen auch in der Natur auftritt, obgleich Amplitude und Ausbreitungsgeschwindigkeit stark variieren können. Bisher wird die Signaltransduktion in der Biologie auf lokale Aktivierungsprozesse von Proteinen durch Signalmoleküle zurückgeführt. Dies induziert in der Folge eine Konformationsänderung der Proteine, die ihrerseits wieder neue Signalmoleküle freisetzen kann. Im Prinzip können Signale somit über die Grenzschicht transportiert werden. Bereits 2012 wurde von Matthias Schneider vorgeschlagen, dass akustische Pulse eine physikalische Möglichkeit zur biologischen Kommunikation darstellen könnten [7]. Die Ergebnisse in diesem Kapitel gehen dabei noch einen Schritt weiter. Sie verbinden die Physik adiabatischer Pulse mit der Biochemie von Grenzflächen. Deshalb wird in dieser Arbeit ein neues Konzept der spezifischen Signaltransduktion vorgeschlagen, dass nicht auf Konfor-

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzsichten

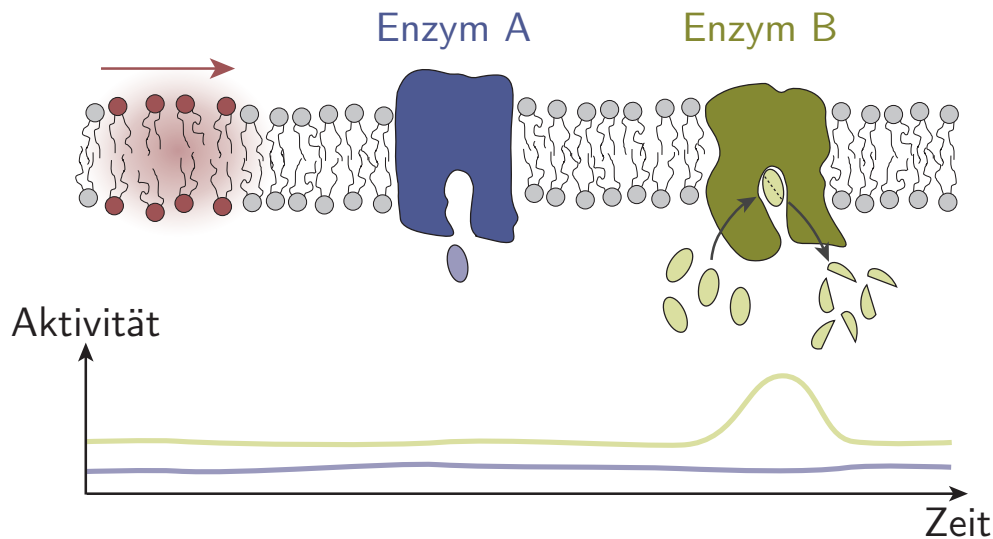


Abbildung 4.15.: Spezifische Puls-Enzym-Wechselwirkung: Aufgrund der mechanischen, elektrischen und chemischen Eigenschaften der Pulse, kann es zu verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Puls und membrangebundenen Proteinen kommen. Der Einfachheit halber wird in diesem Beispiel nur der Effekt einer lokalen pH-Wert-Änderung betrachtet. Im Falle, dass der pH am Enzym weit von dessen pH-Optimum entfernt ist, wird der Puls einen kaum nachweisbaren Effekt auf die Enzymaktivität besitzen (Enzym A). Verschiebt der Puls aber den lokalen pH in Richtung pH-Optimum, kann es zu einem deutlichen Aktivitätszuwachs kommen (Enzym B). Prinzipiell ist hier aber auch ein Katalyse-Stopp bzw. eine Umkehrung der Reaktion in Richtung Synthese denkbar.

mationsumwandlungen beruht, sondern auf thermodynamischen Zustandsänderungen*. Es basiert auf zwei Pfeilern:

Erstens auf der spezifischen Erregbarkeit: Viele Enzyme, wie beispielsweise die Esterasen oder Lipasen, katalysieren Reaktionen, die lokal Protonen freisetzen. Falls die Protonenkonzentration an der Grenzsicht in genügend kurzer Zeit eine bestimmte Schwelle übersteigt, wird ein akustischer Puls ausgelöst. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Pulsamplitude hängt dabei vom pK_s -Wert der Lipide und der Anregungsstärke ab. Die Spezifität der Erregung ist demzufolge auf die Spezifität des Protonierungsübergangs zurückzuführen.

Der zweite Pfeiler basiert auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen Pulsen und Proteinen: Aufgrund ihrer mechanischen, elektrischen und vor allem chemischen Eigenschaften, werden die Wellenpakete unweigerlich einen Effekt auf die Funktion von Membranproteinen bewirken. So ist z. B. eine Änderung der Enzymaktivität oder das Öffnen bzw. Schließen

* Auch diese Idee geht ursprünglich auf Matthias Schneider zurück.

von Kanälen denkbar. In Abbildung 4.15 sind zwei mögliche Extremfälle einer Puls-Enzym-Wechselwirkung dargestellt. Liegt der lokale pH-Wert weit entfernt vom pH-Optimum des Enzyms, so übt der Puls nur einen minimalen Einfluss auf dessen Enzymaktivität aus. Liegt der lokale pH-Wert hingegen in der Nähe des pH-Optimums, so kann die Enzymaktivität extrem schwanken: Verschiebt sich der lokale pH während des Pulses in Richtung des pH-Optimums, kommt es zu einem starken Aktivitätszuwachs. Wird der pH im Gegensatz dazu aber vom pH-Optimum weggetrieben, so kann sich die Katalyse deutlich verlangsamen. Neben der Aktivitätsänderung kann der Puls gleichzeitig auch das lokale Reaktionsgleichgewicht beeinflussen. Sind beispielsweise Protonen an einer Reaktion beteiligt, so führt die Protonenverarmung an der Schicht während des Pulses zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts. Je nachdem ob die Protonen auf der Produkt- oder der Substratseite der Reaktion stehen kann dies im Extremfall sogar zur Synthese führen.

Diese beiden Vorgänge ergeben zusammengefasst, einen Mechanismus zur spezifischen Kommunikation: Nur wenn 1.) der Stimulus eines Enzyms A groß genug ist um ein propagierendes Signal auszulösen und 2.) die Pulse eine signifikante Zustandsänderung des Enzyms B bewirken, kommt es zu einem „Informationsaustausch“ zwischen den beiden Enzymen.

Dass diese Idee nicht völlig abwegig ist, zeigt das Gedankenexperiment, den Farbstoff als Modell für Membranproteine anzusehen. Der pK_S -Wert der fluoreszierenden Kopfgruppe von OG liegt bei 4,7 und bestimmt die Protonierung des Farbstoffs in Bezug zum lokalen pH-Wert. Die deprotonierte Form besitzt ein größeres Übergangsdipolmoment als die protonierte Form und emittiert daher mit größerer Intensität. Gleichwohl führt das größere Übergangsdipolmoment auch zu einer stärkeren Solvatisierung des Moleküls und verschiebt das Emissionsspektrum zu längeren Wellenlängen (Rotverschiebung) [147]. Folglich impliziert eine Verschiebung des Emissionsspektrums während des Pulses nicht nur eine Veränderung des Protonierungszustands, sondern gleichzeitig auch eine Konformationsänderung des solvatisierten Farbstoffkomplexes. Im Fall eines Enzym-Substrat-Komplexes würde man demzufolge während eines Pulses ebenfalls eine Konformationsänderung erwarten. Dies könnte beispielsweise durch eine (De-)Protonierung des aktiven Zentrums geschehen und hätte direkt Einfluss auf die Kinetik der katalysierten Reaktion.

Im Vergleich zu anderen Modellen folgt die Spezifität dieser Art der (Zell-)Kommunikation aus thermodynamischen nichtlinearen Übergängen und beruht nicht auf rein strukturellen Überlegungen. Die Funktion von Proteinen wird nicht allein durch deren Konformation vorgegeben, sondern es sind vielmehr alle thermodynamischen Variablen des Systems involviert. Die Spezifität einer Signaltransduktion kann durch zusätzliche nichtlineare Relationen zwischen der Proteinfunktion und anderen physikalischen Parametern, wie beispielsweise Kompressibilität, Wärmekapazität, Elektrische Kapazität etc. weiter erhöht werden. Viele dieser Relationen wurden in der Tat schon experimentell beobachtet. Die maximale Aktivität der Enzyme Phospholipase A₂ und Phospholipase C im Phasenübergang von Membranen gehört

4. Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzsichten

hierbei zu den am besten untersuchten Systemen [76, 78, 69, 77]. Auch die Pulse selbst können das „Signaling“ noch spezifischer machen. Unter bestimmten Bedingungen können die linearen Pulse, wie bereits im Kollisionsteil erwähnt, in nichtlineare Bereiche (solitäre Wellen) übergehen. Hierdurch wäre die Erregung von Pulsen an eine Nichtlinearität der Grenzsicht, wie zum Beispiel einen Phasenübergang, gekoppelt. Aus all diesen nichtlinearen Prozessen wird aus der vorgeschlagen Signaltransduktion ein extrem spezifischer Vorgang, der allein auf den physikalischen Eigenschaften der Grenzfläche beruht.

Ob das hier vorgestellte Modell realistisch ist, wollen wir im letzten und abschließenden Kapitel an Puls-Enzym-Experimenten überprüfen.

5. Puls-Enzym-Wechselwirkung

Die Fragen, wie Prozesse innerhalb einer Zelle vernetzt sind und wie die Zellen untereinander kommunizieren und wechselwirken, gehören zu den zentralen Forschungsthemen in der Biologie. Bisher wird die biologische Signaltransduktion auf molekulare Aktivierungsprozesse zurückgeführt, die in der Folge den diffusionsgesteuerten Transport von Molekülen induzieren [148]. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Weiterleitung von extrazellulären Signalen durch die G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren ins Zellplasma [149, 150, 151, 152]. Dieser Prozess resultiert einerseits aus der bindungsinduzierten Konformationsänderung des Rezeptors und andererseits aus der Diffusion der freigesetzten Signalmoleküle. Das im letzten Kapitel vorgeschlagene Modell stützt sich hingegen auf die klassische Kontinuumsphysik. Externe Störungen, wie z.B. Druck-, Temperatur- oder pH-Änderungen, führen zu propagierenden Pulsen in der Grenzschicht. Die Grenzschicht besitzt ein eigenes Entropiepotential und ist damit weitgehend von den Prozessen im dreidimensionalen Bulk entkoppelt [33, 7] (siehe Abschnitt 2.3). Kommunikation über akustische Pulse bietet im Vergleich zur Diffusion viele Vorteile: Sie ist adiabatisch, gerichtet, signifikant schneller und benötigt darüber hinaus keinerlei Materialtransport. Trotzdem gibt es bisher noch **keine** Experimente, die den Einfluss akustischer Pulse auf Proteine in Grenzschichten untersuchen. Dies steht im absoluten Gegensatz zur unüberschaubaren Zahl an quasi-statischen Experimenten an Proteinen. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das pH-Optimum von Enzymen. Jedes Enzym weist bei einem bestimmten pH-Wert ein Aktivitätsmaximum auf [153, 66]. Jedoch können auch andere Variablen Enzyme nachhaltig beeinflussen. Es ist beispielsweise dokumentiert, dass die Kettenlänge von Lipiden die Aktivität von membrangebundenen Enzymen verändern kann [154, 155]. Dies wird mit einer Variation des lokalen elektrischen Feldes in Verbindung gebracht. Besonders eindrücklich zum Effekt von elektrischen Feldern auf Enzyme sind die Arbeiten von Thuren et al. und Maggio [156, 157]. In den beiden Publikationen wird die Aktivität des Enzyms Phospholipase A₂ in einer Lipidmonoschicht durch ein äußeres elektrisches Feld gesteuert. Wie in Kapitel 3 erläutert wurde, kann auch der Lateraldruck die Aktivität von Enzymen kontrollieren. Nimmt man all diese Ergebnisse zusammen, so ergibt sich ein einfaches Bild: **Jede** thermodynamische Variable beeinflusst die Enzyme. Folglich ist deren Aktivität eine Funktion all dieser Variablen x_1, x_2, \dots, x_n und spannt einen n-dimensionalen Phasenraum auf, der die Optimierung der Katalyse erlaubt. Aufgrund der mechanischen, elektrischen und chemischen Komponenten der Pulse ist daher zu erwarten, dass Proteine auf die propagierenden Zustandsänderungen reagieren werden.

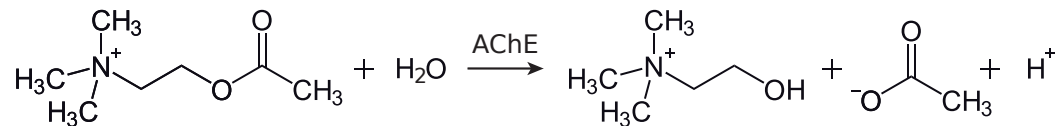
5. Puls-Enzym-Wechselwirkung

Diese Hypothese wird im Folgenden an den Enzymen Acetylcholinesterase und Phospholipase A₂ getestet.

5.1. Wechselwirkung zwischen Pulsen und der Acetylcholinesterase

5.1.1. Vorstellung der Acetylcholinesterase

Die Acetylcholinesterase (AChE) findet man bei Säugetieren in hoher Konzentration hauptsächlich im synaptischen Spalt. Dort baut sie den während der Nervenreizleitung freigesetzten Neurotransmitter Acetylcholin ab und beendet damit die Nervenregung [158, 119, 159]. Die katalytische Spaltung geschieht innerhalb von wenigen Millisekunden, was zu einem pH-Abfall im Spalt führt [160]. Die hydrolysierte Reaktion lautet:



Aufgrund der frei werdenden Protonen ist es durchaus denkbar, dass die Nervenregung nicht unbedingt auf die Bindung von Acetylcholin an den zugehörigen Rezeptor angewiesen ist, sondern, wie experimentell im letzten Kapitel demonstriert, durch die pH-Erniedrigung an der Grenzschicht hervorgerufen werden könnte. Diese Idee ist nicht neu, sondern wurde bereits vor Jahrzehnten als Möglichkeit zur Nervenregung vorgeschlagen [161, 162, 159]. Jedoch muss klar angemerkt werden, dass die Zeitskalen der pH-induzierten Pulse (\sim s) und der Aktionspotentiale (\sim ms) deutlich unterschiedlich sind. Hier bedarf es weiterer Forschung, um mehr über die Relevanz der pH-Erniedrigung für die Erregung von Neuronen herauszufinden.

Für die nachfolgenden Experimente wird die AChE aus dem elektrischen Organ des kalifornischen Zitterrochens (*torpedo californica*) benützt [163]. Der sogenannte Elektrophox besteht aus einer seriellen Anordnung von Zellen, die es dem Fisch ermöglichen enorme Spannungen von über 500 V aufzubauen [164]. Vermutlich war es auch der Aufbau dieses Organs, der Alessandro Volta zum Design der ersten Batterie in Form einer gestapelten Säule inspirierte („Volta’sche Säule“) [165]. Die verwendete Form der AChE wird am Lehrstuhl von Prof. Silman am Weizmann Institut in Rehovot mit Cholsäure aus dem Elektrophox des Rochens herausgelöst und aufgereinigt. Sie verfügt über einen Glykolipid-Phosphatidylinositol-Anker, über den das Enzym an die Membran bindet [163, 166]. Das Enzym besitzt einen dimeren Aufbau, wodurch der Membrananker aus insgesamt vier Kohlenwasserstoffketten besteht. Das aktive Zentrum der AChE wird aus einer Serin-, Glutamat-, Histidengruppe gebildet und liegt 20 Å tief im Inneren des Enzyms verborgen [102]. Die AChE weist ein starkes Dipolmoment auf, welches das positiv geladene Substrat Acetylcholin in Richtung des aktiven Zentrums lenkt [167].

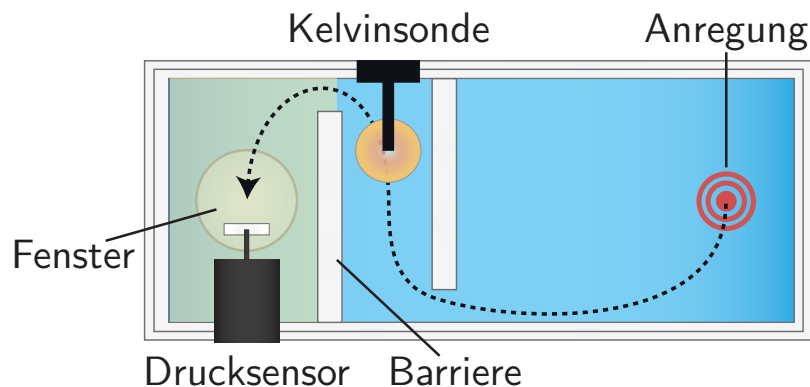


Abbildung 5.1.: Aufbau der Enzym-Puls-Experimente: Mit der in Kapitel 4 charakterisierten Gasanregung werden Pulse in der Lipidmonolage ausgelöst. Diese propagieren an zwei Barrieren vorbei zum enzymhaltigen Bereich der Lipidmonolage. Dies ist anhand der leichten Gelbfärbung der Subphase illustriert. Die Pulspropagation wird durch die Kelvinsonde sowie den Drucksensor erfasst. Die Aktivität der Enzyme wird gleichzeitig mit einem kolorimetrischen Nachweis über die Lichtabsorption bei 410 nm bestimmt.

Die AChE wurde für die Pulsversuche ausgewählt, da uns hierfür auf der einen Seite ein weltweit angesehener Experte zur Seite stand (Prof. Silman [102, 168, 169, 170]) und andererseits der verfügbare Enzymassay bereits sehr gut charakterisiert ist. Der Assay ist unter dem Namen „Ellman Nachweis“ bekannt und basiert auf dem Abbau von Acetylthiocholin [171, 172, 173]. Das Reaktionsprodukt Thiocholin reagiert weiter mit einem 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)-Dianion (DTNB) zum chromophoren Thionitrobenzoat (TNB). TNB absorbiert maximal bei einer Wellenlänge von 410 nm und ermöglicht dadurch die Aktivitätsbestimmung der Enzyme.

5.1.2. Methodik der Puls-Enzym-Messung

Um den Einfluss der Pulse auf die AChE zu untersuchen, wird der Aufbau von Abbildung 5.1 verwendet. Die Erregung von Pulsen erfolgt, wie zuvor, mittels einer lokalen Gasanregung (siehe Kapitel 4). Im linken Bereich der Filmwaage werden 3 µl einer 68 µg/ml Lösung AChE auf die Monoschicht aufgebracht und verteilt. Dies ist in der schematischen Abbildung anhand der leichten Färbung dieses Bereichs kenntlich gemacht. Mittels zweier Teflonbarrieren wird die Diffusion und Konvektion der Enzymmoleküle aus diesem Bereich heraus eingeschränkt. Mit dem Drucksensor kann die Ankunft des Pulses im enzymhaltigen Teil der Grenzschicht verfolgt werden. Simultan dazu wird das Oberflächenpotential der Grenzfläche mit einer Kelvinsonde aufgezeichnet und die Aktivität der Enzyme mittels Lichtabsorption gemessen. Für

5. Puls-Enzym-Wechselwirkung

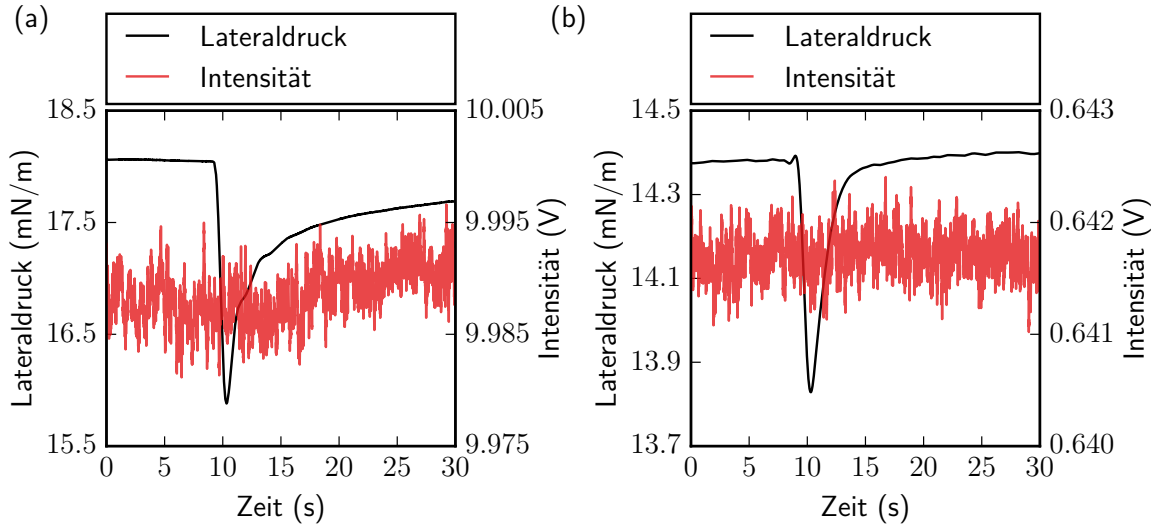


Abbildung 5.2.: Referenzmessungen zum Ellman-Nachweis: **(a)** Acetylthiocholin und DTNB: Der Puls übt keinen Einfluss auf die Moleküle in der Subphase aus. Dies ist an der konstanten Intensität zu erkennen. **(b)** Thionitrobenzoat: Auch das farbige Nachweisprodukt des Ellman-Assays reagiert nicht auf die propagierenden Pulse in der Grenzschicht. Der Unterschied zwischen den beiden (Druck-)Pulsen in **(a)** und **(b)** ergibt sich aus dem Abbau von Acetylthiocholin. Dies säuert die Lösung nach und nach etwas an, wodurch die Erregung zu kleineren Pulsamplituden führt (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 25 °C, 0,3 bar Anregung, 2 mM Acetylthiocholin, 2 mM DTNB).

die Aktivitätsbestimmung ist eine blaue LED (Emissionsmaximum bei ~ 412 nm) oberhalb der Lipidmonolage angebracht und die transmittierte Lichtintensität wird mit einer Diode unterhalb des eingebauten Quarzfensters aufgenommen. Aus der Intensitätsänderung während der Katalyse kann mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz (vgl. Gleichung 3.19) auf die Aktivität der Enzyme, d. h. die Änderung der Substratkonzentration pro Zeiteinheit, geschlossen werden: $k = \frac{\partial c}{\partial t} \propto -\frac{d}{dt} [\log(I)]$.

5.1.3. Referenzmessungen

Um Artefakte des Enzymassays auf die Puls-Enzym-Messungen auszuschließen, werden Referenzmessungen durchgeführt. Zunächst wird der unkatalysierte Fall, bei dem sowohl Acetylthiocholin als auch DTNB in der Subphase vorliegen, betrachtet. Abbildung 5.2a zeigt, dass die Pulse einen vernachlässigbaren Effekt auf die Moleküle besitzen. Im Vergleich zur Streuung des Intensitätssignals über den Messzeitraum von 30 s bleibt die Intensität während des Pulses konstant. Die zweite Referenzmessung betrifft das Reaktionsprodukt des Ellman-Nachweises. Damit eine mögliche Wechselwirkung der Pulse mit dem Thionitrobenzoat festgestellt werden

5.1. Wechselwirkung zwischen Pulsen und der Acetylcholinesterase

kann, wird AChE zum Acetylthiocholin und DTNB in die Subphase der Filmwaage hinzugefügt. Nach einigen Stunden ist keine Intensitätsänderung mehr festzustellen und die Reaktion somit im Gleichgewicht. Auch in diesem Fall ist kein Effekt der Pulse auf die Lösung nachweisbar (siehe Abbildung 5.2b). Da die Pulse den Ellman-Assay nicht beeinflussen, eignet sich dieser hervorragend dafür, den Effekt der Schallwellen auf die Aktivität der AChE in einer Lipidmonolage zu untersuchen.

5.1.4. Experimentelle Untersuchung der Wechselwirkung

Die Wechselwirkung zwischen den Pulsen und der Acetylcholinesterase wird in der Folge mit verschiedenen Anregungsarten studiert. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und der Nähe zur Biologie wird mit den HCl-induzierten Pulsen begonnen.

„HCl-Pulse“

Die Anregung der Monolage mit einer 32%igen HCl-Lösung führt, wie in Kapitel 4 ausführlich beschrieben, zu einem propagierenden Puls. Abbildung 5.3a zeigt den Effekt eines Pulses auf den Lateraldruck und die Transmissionsintensität während der Katalyse der AChE. Sobald der Puls den enzymhaltigen Bereich der Monoschicht erreicht, nimmt nicht nur der lokale Lateraldruck signifikant ab, sondern gleichzeitig auch die gemessene Intensität. Das bedeutet, dass die Enzyme in dieser Phase deutlich aktiver sind und wesentlich mehr Substratmoleküle pro Zeiteinheit abbauen als zuvor. Um den Aktivierungseffekt auf die Enzyme sichtbar zu machen, wird die Intensitätskurve der Abbildung 5.3a durch einen Fit angenähert und daraus die Aktivität der Enzyme berechnet (siehe Abbildung 5.3b). Während des Druckabfalls erhöht sich die Katalyserate der Enzyme um etwa den Faktor neun, bevor sie in der Relaxationsphase des Pulses gegen Null geht. Die Biphasigkeit der Enzymaktivität korreliert zeitlich mit der Druckänderung der Grenzschicht: In der Expansionsphase steigt die Aktivität deutlich an, während die Enzyme in der Kondensationsphase praktisch nicht aktiv sind. Sobald der Druck zurück ins Gleichgewicht relaxiert, nimmt auch die Aktivität der AChE wieder ihren vorhergehenden Gleichgewichtswert an. Die Pulse modulieren also eindeutig die Enzymaktivität. Dieses biphasische Verhalten steht im klaren Widerspruch zu isothermen Messungen. Bei quasi-statischer Kompression bzw. Expansion der Grenzschicht ist die Aktivität der AChE annähernd konstant (siehe Anhang A.9). Wie schon während der Pulsexperimente für den lokalen Grenzflächen-pH beobachtet, reagiert die Grenzschicht auch in diesem Fall unterschiedlich auf adiabatische und isotherme Zustandsänderungen.

Das diskutierte biphasische Verhalten der Enzyme während der Pulspropagation stellt keinen Einzelfall dar, sondern vielmehr den Normalfall. Es ist jedoch anzumerken, dass die Ausprägung der beiden Phasen und dabei insbesondere die Ausprägung der ersten Phase stark zwischen den einzelnen Messungen schwankt. Die gemessene Intensitätsabnahme variiert in jeder Messung und ist in einigen Fällen gar nicht zu beobachten. Dies erschwert quantita-

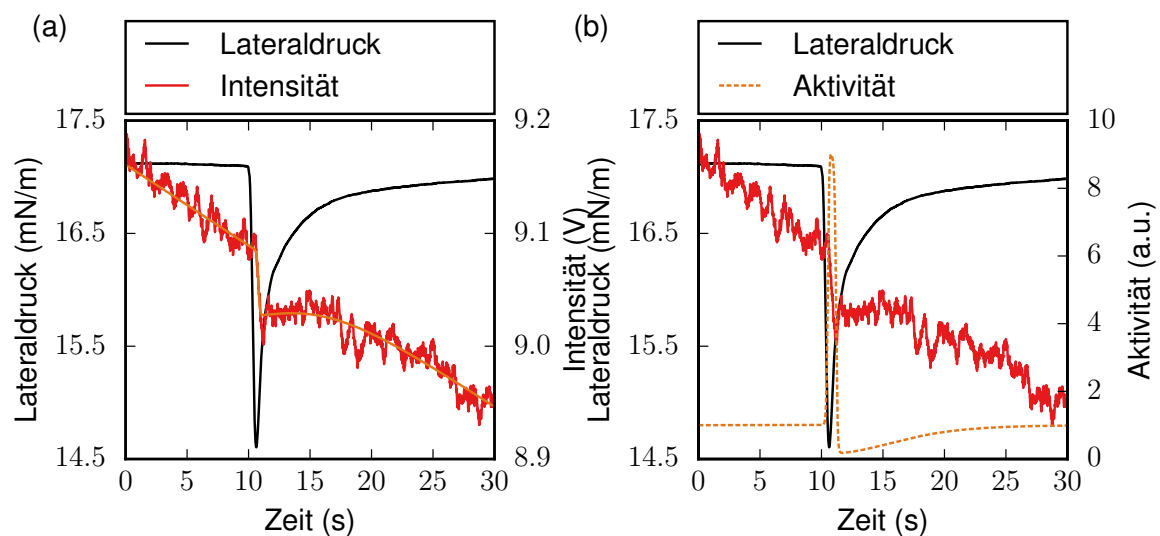


Abbildung 5.3.: Acetylcholinesterase-HCl-Puls-Wechselwirkung 1: **(a)** Die gasförmige HCl-Anregung führt zu einem propagierenden Puls in der Monoschicht. Das Enzym Acetylcholinesterase ist Teil der Grenzschicht und reagiert auf den Puls mit einer Aktivitätsänderung. Während der Expansionsfront nimmt die katalytische Rate deutlich zu, was an der starken Intensitätsabnahme zu erkennen ist. In der nachfolgenden Kondensation der Grenzschicht zurück ins Gleichgewicht, stoppt der Substratabbau hingegen fast vollständig. Die orange Linie ist eine abschnittsweise gefittete Funktion der gemessenen Intensität. Die Ableitung dieser Funktion ist in **(b)** aufgetragen und korrespondiert näherungsweise mit der Aktivität der Enzyme (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, 25 °C, 0,3 bar Anregung, 2 mM Acetylthiocholin, 2 mM DTNB).

5.1. Wechselwirkung zwischen Pulsen und der Acetylcholinesterase

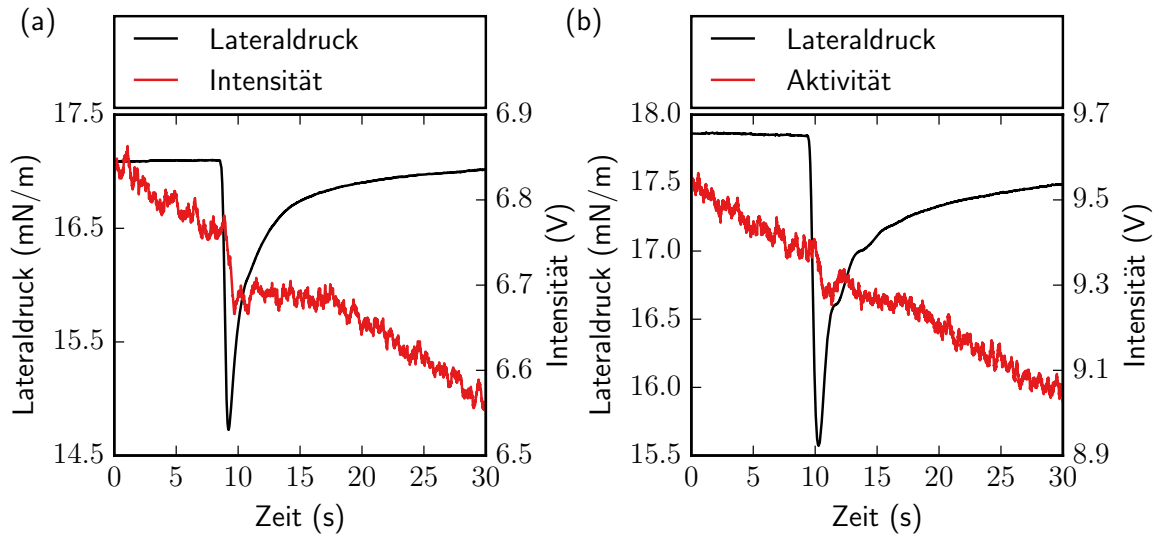


Abbildung 5.4.: Acetylcholinesterase-HCl-Puls-Wechselwirkung 2: (a) und (b) stellen zwei weitere Messungen zum Effekt von HCl-induzierten Pulsen auf die Aktivität der Acetylcholinesterase dar. In beiden Abbildungen ist die biphasische Variation der Enzymaktivität durch den Puls deutlich an den Intensitätskurven zu erkennen. Ferner illustrieren die Graphen, dass sich der Effekt quantitativ von Messung zu Messung unterscheidet (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, 25 °C, 0,3 bar Anregung, 2 mM Acetylthiocholin, 2 mM DTNB).

tive Aussagen über die Kopplung von Druck und Enzymaktivität. Hinzu kommt, dass der Abbau von Acetylthiocholin nicht direkt detektiert werden kann, sondern an die makroskopische Reaktion des Produkts mit DTNB gekoppelt ist. Das heißt, die Ergebnisse können unter Umständen durch die inhomogene Verteilung des Enzyms verfälscht werden. Zwei weitere Beispiele für die Puls-Enzym-Wechselwirkung sind in Abbildung 5.4 aufgetragen. Diese illustrieren die Bandbreite des Effekts.

Für zeitlich längere Untersuchungen der Puls-Enzym-Wechselwirkung, bieten sich die CO₂-induzierten Pulse an. Bei diesen Pulsen erstrecken sich Expansions- und Kondensationsphase über einen größeren Zeitraum hinweg, wodurch die makroskopische Intensitätsmessung genauer wird.

„Kohlenstoffdioxid-Pulse“

Für die CO₂-Anregung wird mittels eines Massendurchflussreglers ein konstanter Gasfluss von 150 ml/min eingestellt und dieser für 15 Sekunden auf die Lipidmonolage geleitet. Abbildung 5.5a stellt eine repräsentative Kurve der Wechselwirkung zwischen den CO₂-induzierten Pulsen und der Acetylcholinesterase dar. Auch mit dieser Anregungsart ergibt sich ein biphasisches Aktivitätsverhalten der Enzyme. In diesem Fall korreliert das Drucksignal aber

5. Puls-Enzym-Wechselwirkung

nicht mehr genau mit den zwei Aktivitätsphasen des Enzyms. Noch während des Druckminimums geht die Aktivität der AChE von ihrem Maximalwert auf annähernd Null zurück, was an dem horizontalen Bereich der Intensitätskurve zu erkennen ist. Im Gegensatz hierzu, korreliert das gemessene Oberflächenpotential sehr gut mit dem Intensitätssignal (siehe Abbildung 5.5b). Das biphasische Verhalten des Oberflächenpotentials spiegelt sich in der transmittierten Intensität wider. Noch deutlicher lässt sich diese Korrelation herausarbeiten indem man das Intensitätssignal abschnittsweise fittet und daraus die Aktivität berechnet (siehe Abbildung 5.5d). Die katalytische Rate erhöht sich während der Expansionsfront um etwa den Faktor drei. Der Beschleunigungseffekt ist damit etwas geringer als im Fall der HCl-induzierten Pulse. In der Kondensationsphase stoppt wiederum der Abbau des Substrats fast komplett. Aus Gleichung 2.19 folgt, dass das Oberflächenpotential und die lokale Ionenkonzentration direkt voneinander abhängen. Dieses Phänomen konnten wir bereits im letzten Kapitel anhand der Protonen beobachten, gilt aber prinzipiell für alle vorhandenen Ionen in der Subphase. Das unterschiedliche Verhalten von Druck und Oberflächenpotential ist bei den CO₂-induzierten Pulse auf die lange Anregungsdauer von 15 s zurückzuführen. Die Pulse sind in diesem Fall nicht mehr rein adiabatisch. Während an der Anregungsstelle immer noch CO₂ auf die Oberfläche trifft und der globale Lateraldruck unterhalb des Gleichgewichtswertes verbleibt, relaxieren die Lipidkopfguppen im enzymhaltigen Teil der Monolage bereits zurück in ihren Normalzustand, d. h. sie nehmen die abgegebenen Protonen wieder auf. In der Folge steigt das Oberflächenpotential kurzzeitig über seinen Gleichgewichtszustand und zeigt damit im Gegensatz zum Druck das charakteristische Verhalten einer adiabatischen Anregung (vgl. Abschnitt 4.4.2). Bezogen auf das letzte Kapitel bedeutet dies wiederum, dass der Grenzflächen-pH-Wert zunächst basischer wird, dann aber kurzzeitig unter seinen Gleichgewichtswert fällt. Ein weiteres Beispiel für eine AChE-CO₂-Puls-Wechselwirkung befindet sich in Anhang A.10.

Zusammenfassend führen die pH-induzierten Pulse zu einer klaren biphasischen Modulation der Enzymaktivität (vgl. Abbildungen 5.3 und 5.5). Dabei korreliert insbesondere das Oberflächenpotential mit der katalytischen Rate des Enzyms.

Bis jetzt basierten die Experimente zur Puls-Enzym-Wechselwirkung auf einer lokalen pH-Erniedrigung und den daraus resultierenden „Expansionspulsen“. Daher ergibt sich die Frage, was im umgekehrten Fall passiert: Interagieren „Kondensationspulse“ ebenfalls mit den Enzymen und falls ja, wie äußert sich dies? Diese Fragestellung wird im nächsten Abschnitt mit *n*-Hexan-induzierten Pulsen diskutiert.

„Hexan-Pulse“

Zur Anregung von Pulsen, die zu einem kurzzeitigen Druckanstieg führen, wird *n*-Hexan verwendet. *n*-Hexan ist ein unpolares Lösungsmittel und löst sich deshalb sehr gut im Bereich der hydrophoben Lipidketten. Es besitzt einen relativ hohen Dampfdruck von 162 hPa und

5.1. Wechselwirkung zwischen Pulsen und der Acetylcholinesterase

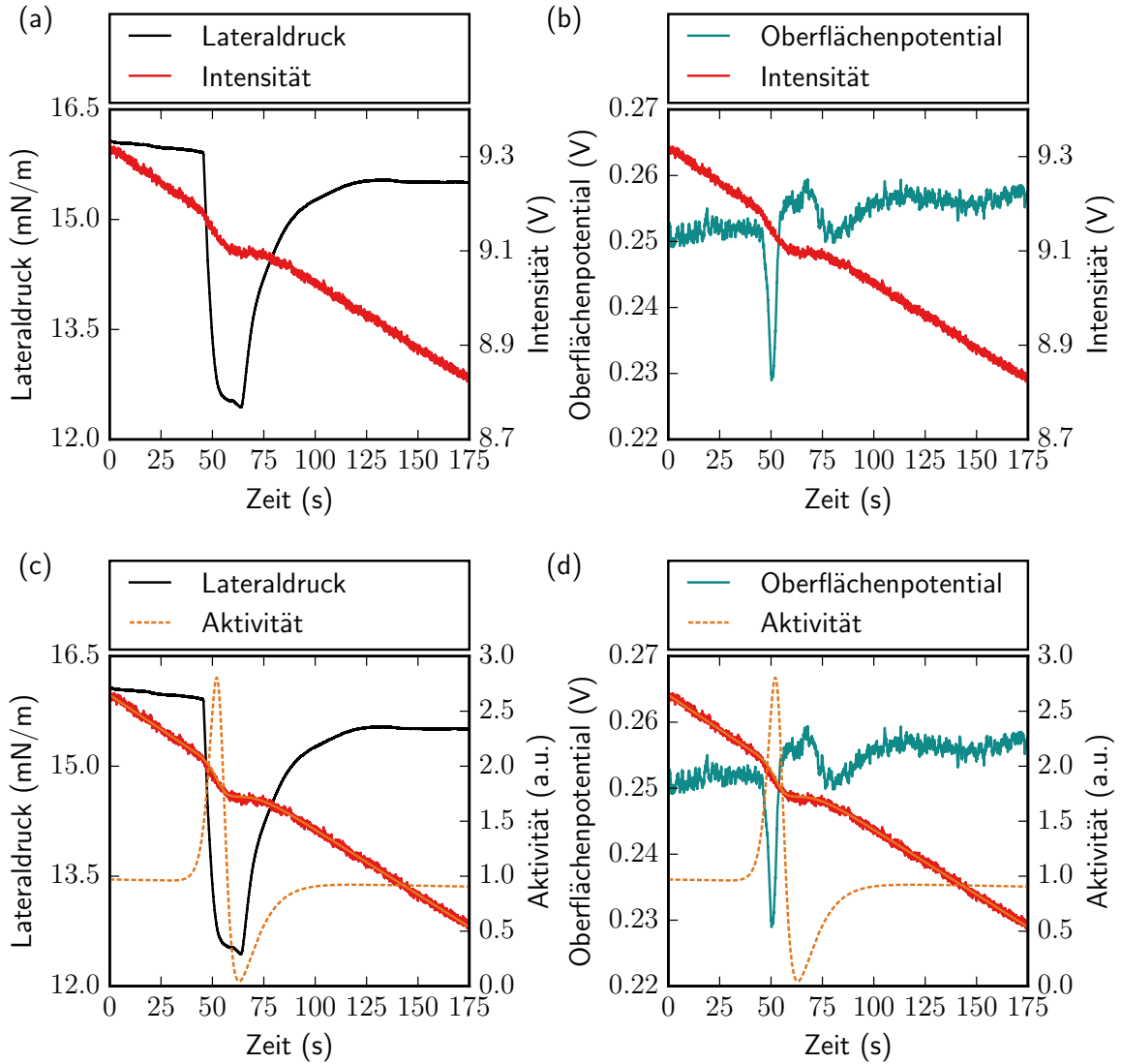


Abbildung 5.5.: Acetylcholinesterase- CO_2 -Puls-Wechselwirkung: **(a)** Der CO_2 -induzierte Puls propagiert über die gesamte Grenzschrift und führt im enzymhaltigen Teil der Monoschrift zu einer Lateraldruckerniedrigung von ca. 3,5 mN/m. Während der Ankunft des Pulses fällt die transmittierte Intensität zunächst stark ab und geht anschließend in ein horizontales Plateau über. Das bedeutet, dass die Enzyme zunächst sehr aktiv sind, bevor die Katalyse anschließend fast vollständig gehemmt wird (vgl. **(c)**). Wie in **(b)** zu sehen ist, korreliert das gemessene Oberflächenpotential sehr gut mit dem Intensitätssignal. Noch deutlicher wird diese Korrelation, wenn man die Aktivität des Enzyms aus einem Fit des Intensitätssignals berechnet und mit dem Oberflächenpotential vergleicht (siehe **(d)**) (10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, 25 °C, 2 mM Acetylthiocholin, 2 mM DTNB, Anregung 15 s).

5. Puls-Enzym-Wechselwirkung

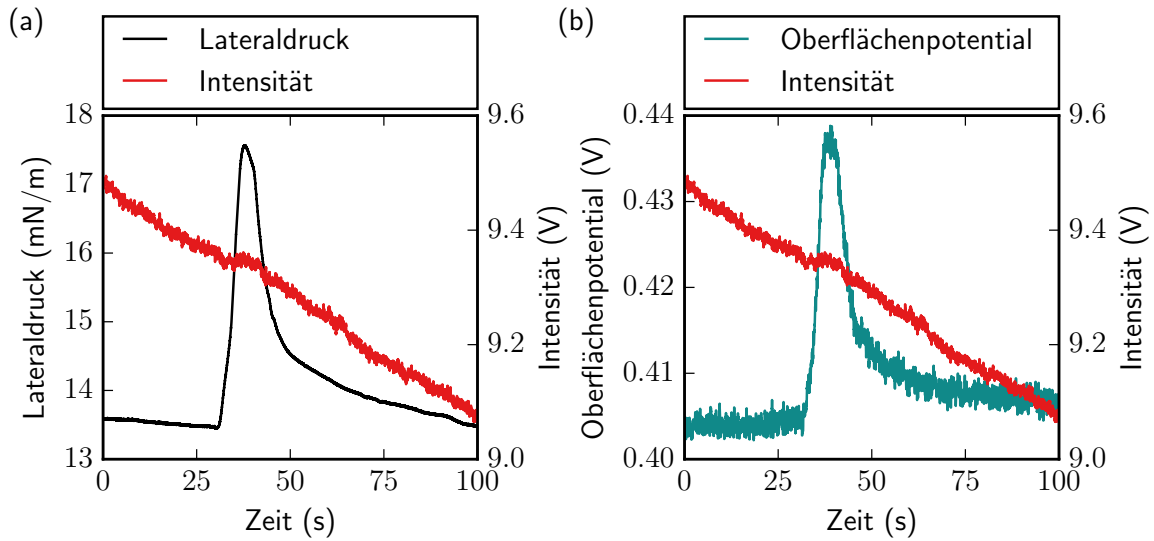


Abbildung 5.6.: Acetylcholinesterase-Hexan-Puls-Wechselwirkung: In (a) ist eine Messung zum Effekt der Kondensationspulse auf die Enzyme zu sehen. Die Intensität nimmt, entsprechend einer signifikant kleineren katalytischen Rate, während des Pulses deutlich langsamer ab als zuvor. Der Puls hemmt also kurzzeitig die Enzyme. In (b) ist der Vollständigkeit halber die simultan propagierende Oberflächenpotentialänderung aufgetragen (10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, 25 °C, 2 mM Acetylthiocholin, 2 mM DTNB, Anregung 15 s).

kann daher gut per Gasanregung über der Lipidmonolage freigesetzt werden (vgl. Aufbau in Abbildung 4.2). Zudem sorgt die Flüchtigkeit des Stoffes dafür, dass es schnell wieder aus der Lipidschicht entweicht.

In Abbildung 5.6 ist die Wechselwirkung der „Hexan-Pulse“ mit der AChE anhand eines charakteristischen Beispiels dargestellt. Das Hexan baut sich in die DMPS-Monolage ein und führt dadurch zu einer propagierenden Kondensationsfront. Die Pulse erstrecken sich über ca. 60 s und sind daher zeitlich mit den CO₂-induzierten Pulsen zu vergleichen. Sobald der Puls den enzymhaltigen Bereich der Grenzschicht erreicht, und dort infolgedessen Druck und Oberflächenpotential rasant ansteigen, fällt die Intensität sehr viel langsamer ab als zuvor. Folglich ist der Substratabbau gehemmt und die Aktivität des Enzyms dementsprechend geringer. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Erkenntnissen von den „CO₂-Pulsen“: Eine Erhöhung des lokalen Oberflächenpotentials über den Gleichgewichtswert hinaus, geht mit einer verringerten Enzymaktivität einher. Sobald der Druck und das Oberflächenpotential zurückgehen, nimmt auch die Enzymaktivität wieder zu. In diesem Fall nimmt der Grenzflächen-pH kurzzeitig ab und es kommt zu einer monophasischen Hemmung der Enzyme. In Anhang A.11 ist ein weiteres Beispiel für die Wechselwirkung der Kondensationspulse mit der AChE dargestellt.

5.1.5. Diskussion

Die Pulsexperimente mit der Acetylcholinesterase belegen eindeutig, dass die propagierenden dynamischen Zustandsänderungen die Enzymaktivität modifizieren. Im Fall der säureinduzierten Expansionspulse ergibt sich eine biphasische Modulation der katalytischen Rate durch den Puls. Im Gegensatz dazu induzieren die Kondensationspulse eine monophasische Hemmung der Enzyme. Wie in Kapitel 4 gezeigt, geht mit einer propagierenden Druck- und Oberflächenpotentialerniedrigung ein Anstieg des lokalen Grenzflächen-pH's einher. Unter Berücksichtigung der bekannten pH-Abhängigkeit der AChE in Lipidvesikelsuspensionen (siehe Abbildung 5.7), sollte dies zu einer Zunahme der Aktivität führen, wie sie in der Tat auch beobachtet wird. Geht man von dem Verhalten der AChE in Vesikeln aus, würde man für eine typische lokale pH-Änderung während eines Pulses von $\Delta\text{pH} \approx 0,6$ einen Anstieg der katalytischen Rate um etwa den Faktor 2 erwarten (vgl. Abbildung 5.7). Dies liegt in der selben Größenordnung, wie der Effekt der CO_2 -induzierten Pulse (vgl. Abbildung 5.5), aber etwas unterhalb der gemessenen Ratenzunahme der HCl-induzierten Pulse (vgl. Abbildung 5.3). Diese Diskrepanz könnte auf die verschiedenen experimentellen Systeme (Vesikel vs. Lipidmonolage) oder auf die unterschiedliche Art der Zustandsänderung (isotherm vs. adiabatisch) zurückzuführen sein. Nach dem steilen Aktivitätszuwachs ist bei beiden Anregungsarten eine fast vollständige Hemmung der Reaktion zu beobachten. Dies ist nicht vereinbar mit der pH-Zunahme an der Grenzschicht während der Pulsausbreitung und der bekannten pH-Abhängigkeit der AChE. Die zunächst stark erhöhte Rate des Substratabbaus bietet einen möglichen Erklärungsansatz hierfür. Neben den Protonen der Lipidköpfe werden noch zusätzlich Protonen durch die Spaltung von Acetylthiocholin frei. Während der Relaxation der Grenzschicht kommt es somit zu einem lokalen Protonenüberschuss, der wiederum zu einer Aktivitätshemmung führen sollte. Diese Darstellung wird durch den biphasischen Verlauf des Oberflächenpotentials der Expansionspulse bekräftigt und passt gleichzeitig zum monophasischen Effekt der Kondensationspulse. Die Kondensationswelle vergrößert die lokale Oberflächenladungsdichte der Grenzschicht, wodurch der pH der Grenzfläche abnimmt. In Übereinstimmung mit den Experimenten sollte die Hydrolyse deshalb langsamer ablaufen (siehe Abbildung 5.7). Während der Relaxation der Kondensationspulse steigt der lokale Grenzflächen-pH wieder an und die Enzymaktivität geht auf ihren vorherigen Wert zurück. Demzufolge ist im Fall der Kondensationspulse kein biphasischer Effekt zu erwarten.

Die lokalen Druck-, Oberflächenpotential- und pH-Änderungen können bzw. werden sich natürlich nicht nur auf die Lipide, sondern auch auf das Enzym selbst auswirken. Die lokale pH-Änderung könnte eine (De-)Protonierung des Enzyms nach sich ziehen und folglich zu einer Änderung von dessen Konformation und Dipolmoment führen. Da das elektrische Feld der AChE das Substrat in Richtung des aktiven Zentrums leitet, würde sich dies direkt auf die Enzymaktivität auswirken [167]. Der Fokus dieser Arbeit liegt aber nicht auf einem molekularen Bild der Vorgänge, sondern auf einer physikalischen Beschreibung der Prozesse. Die

5. Puls-Enzym-Wechselwirkung

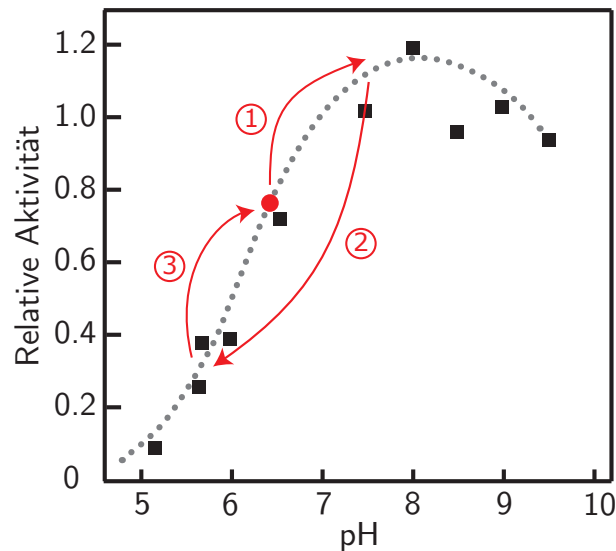


Abbildung 5.7.: pH-Abhängigkeit der Acetylcholinesterase (gemessen in einer Lipidvesikelsuspension): Die Puls-AChE-Experimente werden bei einem pH von 6,5 in der Subphase durchgeführt. Dies ist in der Zeichnung anhand des roten Punktes illustriert. Die propagierenden Pulse ändern reversibel den pH der Grenzschicht. Im Fall einer Expansionsfront steigt der lokale pH an, was zu einer höheren katalytischen Rate des Enzyms führen sollte (1). Vermutlich kommt es während der Relaxation durch den schnellen Substratabbau zu einem Protonenüberschuss an der Grenzfläche, wodurch die beobachtete Aktivitätsabnahme erklärt werden kann (2). Anschließend geht das System wieder ins Gleichgewicht über (3). Im Fall der Kondensationspulse kommt es hingegen nur zu einer Verlangsamung der Katalyse. Der lokale Prozess entspricht daher dem Fall (3) (adaptiert aus [169]).

molekulare Interaktion zwischen den Pulsen und den Proteinen wird mit Sicherheit je nach Protein stark variieren. Entscheidend ist die Feststellung, dass Proteine, wie eindeutig mit der AChE belegt, auf akustische Pulse (dynamische Zustandsänderungen) reagieren.

Abschließend soll mit dem Enzym Phospholipase A₂ veranschaulicht werden, dass es sich bei der Puls-Protein-Wechselwirkung um ein allgemeines Phänomen handelt.

5.2. Wechselwirkung zwischen Pulsen und der Phospholipase A₂

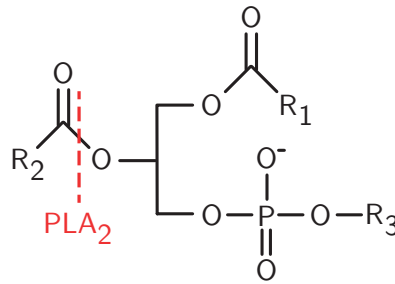


Abbildung 5.8.: Die Phospholipase A₂ katalysiert die Spaltung von Phospholipiden am zweiten Kohlenstoffatom der Glycerolgruppe. Bei der Reaktion wird neben einem Fettsäurerest auch ein Proton frei.

5.2. Wechselwirkung zwischen Pulsen und der Phospholipase A₂

5.2.1. Vorstellung der Phospholipase A₂

Phospholipasen sind in der Natur weit verbreitet und katalysieren spezifisch die Spaltung von Phospholipiden [3]. In großen Mengen finden sie sich besonders in Schlangen- und Insektengiften. Die hohe Enzymkonzentration im Gift greift die Zellmembran an, was den Zelltod herbeiführen kann [3]. Gleichzeitig spielen die Enzyme in moderater Konzentration eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion in Säugetieren [174, 175]. In den folgenden Experimenten wird die Phospholipase A₂ (PLA₂) von *Sigma-Aldrich*, die aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen extrahiert wird, verwendet. Die Enzymlösung liegt in einer Konzentration von 67 mg/ml vor (Aktivität > 600 units/mg). Die PLA₂ wiegt 14 kDa und ist daher nur circa zwanzigmal so groß wie ein Lipid bzw. in etwa zwanzigmal kleiner als die Acetylcholinesterase. Das aktive Zentrum besteht aus einem Histidin-, Asparaginsäure-, Calcium-Komplex [176]. Die Phospholipase A₂ schneidet Phospholipide am zweiten Kohlenstoffatom des Glycerolrückgrats entzwei (siehe Abbildung 5.8) und setzt dadurch einen Fettsäurerest und ein Proton frei [177]. Dies wird häufig ausgenutzt, um die Aktivität des Enzyms mittels Gegenditration von NaOH zu bestimmen [178]. Alternative Möglichkeiten zur Aktivitätsmessung bestehen in der Verwendung von Fluoreszenz- und radioaktiv-gelabelten Substraten [179, 180].

In der Folge wird ein eigener Reaktionsnachweis entwickelt, der die Messung bei konstantem pH und ohne Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt. Dabei wird weiterhin der Messaufbau aus Abbildung 5.1 verwendet, jedoch werden 5 µl der Phospholipase A₂ anstatt der Acetylcholinesterase zugegeben.

5.2.2. Referenzmessungen

Die Besonderheit an der Phospholipase A₂ ist, dass die Grenzschicht, an die sie gebunden ist, gleichzeitig auch ihr Substrat darstellt. Sie verändert also aktiv die Zusammensetzung der Grenzfläche. Die Enzyme reagieren dabei sehr sensitiv auf den Phasenzustand ihrer Umgebung

5. Puls-Enzym-Wechselwirkung

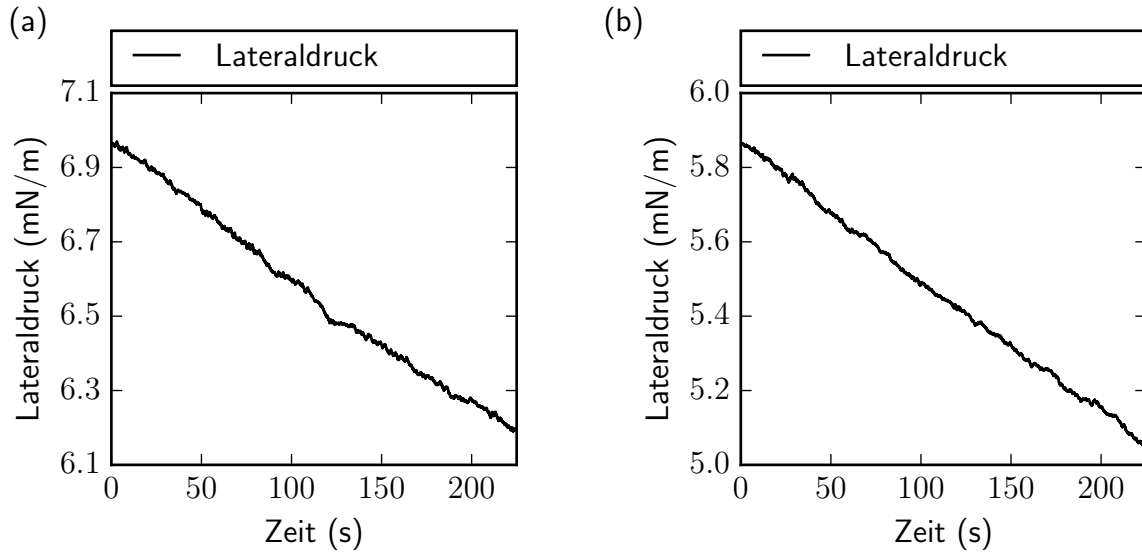


Abbildung 5.9.: Einfluss der Phospholipase A₂ auf eine DMPS-Monolage im isothermen Fall: Die Zugabe von Enzym auf die DMPS-Monolage führt zu einem linearen Druckabfall der Schicht über die Dauer von 225 s. Die beiden Kurven in (a) und (b) demonstrieren, dass dieses Verhalten nicht vom Startdruck abhängt (10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, 20 °C).

und sind maximal aktiv im Phasenübergang der Grenzschicht [181, 76]. In den nachfolgenden PLA₂-Puls-Experimenten bildet das negativ geladene Lipid DMPS die Monoschicht und infolgedessen auch das Substrat. Je nach verwendetem Lipid geht das Reaktionsprodukt in den Bulk über oder aber es wird Teil der Grenzschicht. Im Fall von DMPS führt die Enzymkatalyse, wie in Abbildung 5.9 an zwei Beispielen illustriert, zu einer linearen Abnahme des ansonsten gleichbleibenden Lateraldrucks (vgl. beispielsweise Anhang A.5). Betrachtet man deutlich längere Zeiträume als hier dargestellt, ergibt sich ein exponentieller Abfall von π (nicht gezeigt). Der während der Katalyse abgespaltene Fettsäurerest geht in die Subphase über und senkt dadurch den Lateraldruck der Oberfläche. Die Linearität dieses Vorgangs tritt spezifisch für dieses Lipid auf. Der Abbau anderer Phospholipidmonolagen bewirkt hingegen klar nichtlineare Druckänderungen [182]. Die PLA₂-induzierte lineare Druckabnahme der DMPS-Monolage gestattet es, die Monolage als Aktivitätsassay für die Reaktion zu verwenden und so die Wechselwirkung zwischen der PLA₂ und den akustischen Pulsen zu studieren. Die Monolage übernimmt damit dreierlei Funktionen: Sie fungiert nicht nur als Grenzschicht und Substrat in einem, sondern dient gleichzeitig noch als Aktivitätsnachweis der Enzyme.

5.2.3. Experimentelle Untersuchung der Wechselwirkung

Da die katalytische Rate der PLA₂ deutlich geringer ist als die der AChE, muss die Puls-Enzym-Wechselwirkung entsprechend von längerer Dauer sein, um einen Effekt der Pulse

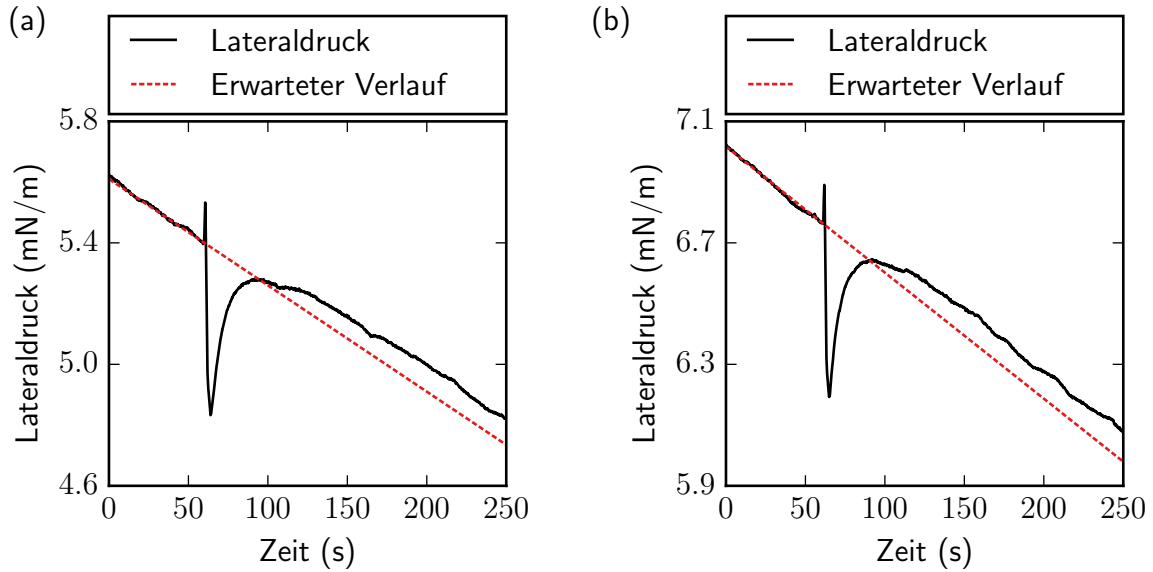


Abbildung 5.10.: Phospholipase A₂-Puls-Wechselwirkung: In (a) und (b) sind zwei Experimente zum Einfluss der Pulse auf die PLA₂ zu sehen. Die PLA₂ katalysiert den Abbau der DMPS-Monolage, was anhand der linearen Druckabnahme zu Beginn der beiden Kurven sichtbar ist. In der Folge variieren die CO₂-induzierten Pulse den lokalen Lateraldruck der Schicht. Nach der vollständigen Relaxation der Monolage nimmt der Druck wieder konstant ab. D. h. die Aktivität der Enzyme nach den Pulsen ist in etwa so hoch wie zu Beginn der Messung. Während der Puls-Enzym-Wechselwirkung kommt es hingegen zu einer Verlangsamung der Katalyse. Dies ist anhand des theoretischen Verlaufs des Lateraldrucks an der rot gestrichelten Linie zu sehen. Der Lateraldruck verbleibt nach dem Puls oberhalb des erwarteten Druckverlaufs (10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, 20 °C).

auf die Enzyme nachweisen zu können [3, 183]. Dafür kommen nur die CO₂-induzierten Pulse in Frage. Daneben bietet die CO₂-Anregung den Vorteil, dass das zugegebene Gas nach und nach wieder aus der Subphase in die Atmosphäre entweicht und der Druck somit in den meisten Fällen zu seinem ursprünglichen Gleichgewichtswert zurückkehrt. Bei der HCl-Anregung ist dies nicht immer gegeben und würde somit die Aktivitätsmessung verfälschen. Abbildungen 5.10 zeigt zwei repräsentative Messkurven einer PLA₂-Puls-Wechselwirkung. Sowohl in (a) als auch in (b) fällt der Druck anfangs linear ab. Die ankommenden Pulse modulieren im weiteren Verlauf den Lateraldruck der Grenzschicht. Nachdem die Monolage vollständig relaxiert ist, nimmt der Lateraldruck mit näherungsweise der selben Steigung ab, wie zu Beginn des Experiments. Vergleicht man indes den laut Referenzmessungen zu erwartenden linearen Druckabfall mit den tatsächlichen Messkurven, so ergibt sich aufgrund der Pulse eine verlangsamte Degradation der Lipidschicht. Der Druck geht nach den Pulsen nicht

5. Puls-Enzym-Wechselwirkung

mehr auf die theoretisch zu erwartende Linie zurück (siehe Abbildung 5.10). Diese Beobachtungen sind stichhaltig, da mögliche Messfehler nur zu einer Unterbewertung des Pulseffektes führen können. In wenigen Fällen kehrt der Druck nach einer Gasanregung nicht mehr ganz auf den Gleichgewichtswert zurück. Dies würde sich folglich gegensätzlich zum Pulseffekt auswirken.

5.2.4. Diskussion

Im Gegensatz zum chromophoren Reaktionsnachweis der AChE kann im Fall der PLA₂ der Pulseffekt auf die Reaktion nicht „live“ verfolgt werden. Deshalb kann auch nicht überprüft werden, ob die Enzymaktivität während des Pulses biphasisch moduliert wird. Nur die integrierte Wirkung der Pulse auf die Enzyme ist nach der Relaxation sichtbar: eine Verlangsamung des Substratumsatzes. Dies ist nicht mit der pH-Abhängigkeit der PLA₂ zu erklären, da das pH-Optimum des Enzyms in etwa bei pH 8 liegt [184]. Die Expansionspulse induzieren eine lokale pH-Erhöhung, was zu höheren katalytischen Raten führen sollte. Laut Literatur reagieren die Enzyme aber ebenfalls sehr sensitiv auf Druck- und Oberflächenpotentialänderungen [182, 181, 156, 157]. Daher liegt es nahe, dass diese konträr zum pH-Effekt auf das Enzym wirken können. Die Abnahme der katalytischen Rate geht also vermutlich auf die pulsinduzierte mechanische und elektrische Zustandsänderung der Enzyme und deren lokaler Umgebung zurück.

Im abschließenden Abschnitt werden die wichtigsten Erkenntnisse der Puls-Enzym-Experimente noch einmal zusammengefasst und die Folgen für biologische Systeme diskutiert.

5.3. Zusammenfassung

Die Ergebnisse in diesem Kapitel belegen erstmals, dass akustische Pulse die Funktion von Proteinen in Grenzschichten beeinflussen. Im Fall der Acetylcholinesterase modulieren die säureinduzierten Pulse die Enzymaktivität biphasisch. In der Expansionsphase nimmt die katalytische Rate der Enzyme um bis zu einer Größenordnung zu, während in der Kondensationsphase praktisch kein Substratabbau mehr stattfindet. Die Pulsanregung durch *n*-Hexan bewirkt dagegen nur ein monophasisches Abbremsen der Enzymkatalyse. Als möglicher Erklärungsansatz für dieses unterschiedliche Verhalten kommen die während der Katalyse freigesetzten Protonen in Betracht. Zusammen mit den von den Lipidköpfen während des Pulses abgegebenen Protonen, kann dies in der Relaxationsphase der Grenzschicht zu einem lokalen Protonenüberschuss führen und somit die Reaktion verzögern. Im umgekehrten Fall der Kondensationspulse nimmt der pH an der Grenzschicht zuerst ab, was folglich zur Enzymhemmung führt. Danach steigt der Grenzflächen-pH wieder an und kehrt, genau wie die katalytische Rate des Enzyms, auf seinen ursprünglichen Gleichgewichtswert zurück. Demnach tritt bei den Kondensationspulsen ein monophasischer Effekt auf.

Die Experimente mit dem Enzym Phospholipase A₂ illustrieren die Universalität dieses Phänomens. Zwar kann in diesem Fall die Puls-Enzym-Wechselwirkung nicht direkt optisch verfolgt werden, dafür ergibt sich aber ein klarer „Netto-Effekt“: Die Pulse verlangsamen den Abbau der Grenzschicht. Wie bereits angesprochen, repräsentieren die Pulse eine dynamische Zustandsänderung. Diese physikalischen Signale erfordern keinerlei Materialtransport zur Propagation sowie zur Kommunikation. Im Prinzip ist aufgrund ihrer adiabatischen Natur auch keine Energie für die Ausbreitung notwendig, wenngleich es in realen Systemen natürlich immer zu dissipativen Prozessen kommt. Proteine, die im Schallpfad der Pulse sitzen, erfahren eine kurzzeitige Änderung ihres Zustands. Da thermodynamisch alle Observablen gekoppelt sind, kommt es gleichzeitig zu lokalen Druck-, Potential-, pH- und Temperaturänderungen. Die Stärke der Änderungen hängt von der Pulsamplitude, dem aktuellen Zustand der lokalen Proteinumgebung und den Eigenschaften des Proteins selbst ab. Demzufolge wird die Protein-Puls-Wechselwirkung für jede Membran, jedes Protein und jede Anregung anders verlaufen. Deshalb stellen die Pulse eine effektive und schnelle Möglichkeit zur spezifischen Signaltransduktion dar. Die Enzym-Puls-Experimente rechtfertigen damit auch das im letzten Kapitel vorgeschlagene Modell.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Abhängigkeit freier Enzyme von äußeren Parametern, wie beispielsweise pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke etc. ist genauestens dokumentiert. Gleichwohl liegt ein Großteil der Enzyme in der Natur nicht frei gelöst vor, sondern ist Teil von quasi-zweidimensionalen (Lipid-)Membranen. Diese biologischen Grenzschichten sind essentiell für das Leben. Jede Zelle verfügt über Membranen, die sie von ihrer Umgebung trennen und in funktionelle Einheiten unterteilen. Prinzipiell stellt aber auch die Hydrathülle eines jeden Moleküls eine Grenzschicht dar. Folglich sind diese von fundamentaler Bedeutung für viele Lebensprozesse. Physikalisch gesehen, können die ubiquitären Grenzschichten als thermodynamisch unabhängige Systeme betrachtet werden, die statische und dynamische Zustandsänderungen erlauben. Trotz der offensichtlichen Relevanz, ist der Einfluss des thermodynamischen Zustands der Grenzschichten auf die Pfeiler der Biochemie, die Enzyme, noch praktisch unerforscht. Dies bringt uns zur eigentlichen Fragestellung dieser Arbeit: *Welche Rolle spielt die Physik von Grenzflächen für die lokalen biochemischen Prozesse?*

Um dem auf den Grund zu gehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Lipidmonolage als experimentelles System auserkoren. Diese stellt ein einfaches Modell für Membranen dar und ihr physikalischer Zustand kann mit Hilfe der Filmwaage gezielt manipuliert und bestimmt werden. Mit dieser Methode wurde der Einfluss statischer und dynamischer Zustandsänderungen auf Enzyme in Lipidmonolagen untersucht.

6.1. Einfluss statischer Zustandsänderungen auf Enzyme

Komprimiert man eine Feder, so ist die benötigte Kraft proportional zu ihrer Federkonstante. Analog kann die quasi-statische Kompression bzw. Expansion einer Monolage betrachtet werden. Die Federkonstante der Grenzschicht, die Kompressibilität, variiert aber im Gegensatz zur Feder stark. Eine große Kompressibilität ist gleichbedeutend mit einer weichen Grenzschicht und kann mit Einsteins Formulierung des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik auf hohe Flächenfluktuationen zurückgeführt werden. Da alle Variablen der Grenzschicht durch die Maxwell-Relationen gekoppelt sind, fluktuieren in diesem Fall auch alle anderen Variablen stark (z. B. die Enthalpie und die Grenzflächenladung). Eine geringe Kompressibilität entspricht im Umkehrschluss einer harten Grenzschicht und damit geringen Fluktuationen des Systems.

Anhand einer Katalase-Monolage wurde demonstriert, dass die Enzyme genau dann am

6. Zusammenfassung und Ausblick

aktivsten sind, wenn ihre Kompressibilität maximal wird. D.h. die katalytische Rate ist an die Fluktuationen des Systems gekoppelt. Mit Hilfe des Enzyms Meerrettichperoxidase konnte gezeigt werden, dass dies auch dann noch gilt, wenn die Monolage nicht mehr rein aus Enzymen gebildet wird, sondern aus einer Lipid-Enzym-Mischung. In diesem Fall reguliert der Phasenzustand der gesamten Grenzschicht die Aktivität der Enzyme. Im Phasenübergang der Grenzfläche nehmen die Fluktuationen sowie die katalytische Rate signifikant zu. Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür bietet die Theorie von Konrad Kaufmann. Das Verhalten der Grenzschicht wird im Rahmen dieser Theorie anhand eines gemeinsamen Entropiepotentials beschrieben. Die Katalyse ergibt sich dann als Folge starker („kritischer“) Fluktuationen des Systems. Die Implikationen dieser Theorie wurden am Beispiel der Aktivierungsenergie von Enzymen in Lipidmembranen behandelt. Dadurch erklärt sich nicht nur der „Knick“ in der Aktivierungsenergie von Enzymen in den verschiedenen Phasenzuständen der Membran, sondern auch das beobachtete Aktivitätsmaximum im Phasenübergang.

Die Korrelation zwischen der Enzymaktivität und den Grenzflächenfluktuationen beruht bisher allein auf makroskopischen Messungen. Zukünftig gilt es deshalb, diese Korrelation durch mikroskopische Messungen „sichtbar“ zu machen. Ein probates Mittel hierfür könnte die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie darstellen. Durch geeignetes „Labeling“ der Enzyme bzw. des Substrats können damit die Fluktuationen des Systems sowie der Substratabbau in Echtzeit optisch verfolgt und Rückschlüsse über die molekularen Prozesse und Zeitskalen gezogen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage, ob der Zusammenhang zwischen den Fluktuationen und der Rate auf alle Katalysatoren ausgeweitet werden kann. Dafür müsste zukünftig eine Methode gefunden werden, die es erlaubt die Grenzflächenfluktuationen von Katalysatoren zu verändern und zu messen. Experimente mit akustischen Oberflächenwellen auf Festkörperkatalysatoren weisen darauf hin, dass deren Oberflächenzustand ebenfalls wesentlich die katalytische Rate beeinflusst [185].

6.2. Dynamische Zustandsänderungen in Lipidmonolagen

Die Signaltransduktion von Zellen gehört zu den Themengebieten der Biologie, an denen am meisten geforscht wird. Die Forschungsanstrengungen fließen hierbei vor allem in die Strukturaufklärung von Kanal- und Rezeptorproteinen und deren molekulare Wechselwirkung mit Signalmolekülen. Die dynamischen Eigenschaften von biologischen Grenzschichten spielen hingegen noch keine Rolle. Um diese besser zu verstehen, wurden Experimente an Lipidmonolagen durchgeführt. Dabei wurde erstmals gezeigt, dass eine lokale pH-Erniedrigung an Lipidmonolagen Pulse auslösen kann. Die Anregung der Schicht konnte mittels dem Einsatz verschiedener Brønsted-Säuren auf die Protonierung der Lipidkopfguppen zurückgeführt werden. Die Protonierung ist auf ein Anregungsfenster beschränkt, das durch den pK_S -Wert der Lipide vorgegeben wird.

6.3. Einfluss dynamischer Zustandsänderungen auf Enzyme

Mit einer lokalen Temperaturänderung wurde belegt, dass im Grunde alle Variablen der Grenzschicht in der Lage sind Pulse hervorzurufen. Dies steht jedoch immer unter der Voraussetzung, dass die Änderung der Variablen ausreichend stark und genügend schnell vonstattengeht. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Pulse hängt von der Kompressibilität der Grenzschicht ab. Dies ist ein typisches Merkmal für akustische Wellenphänomene. Demnach breiten sich die Pulse adiabatisch über die gesamte Grenzschicht aus, wobei die Entropie des Gesamtsystems erhalten bleibt. Die Pulse entsprechen einer propagierenden reversiblen Zustandsänderung der Grenzschicht, die alle messbaren Variablen des Systems mit einschließt. Die induzierten lokalen Änderungen sind mechanisch, elektrisch und chemisch und in Phase miteinander gekoppelt. Durch die lokale Zugabe von Säure kondensiert die Monolage an der Anregungsstelle und eine Expansionsfront breitet sich aus (mechanisch). Diese impliziert gleichzeitig eine Verringerung der Oberflächenladungsdichte (elektrisch), wodurch ein Teil der gebundenen Protonen an der Grenzschicht in die Subphase übergeht und sich der pH-Wert der Grenzfläche erhöht (chemisch). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde ein neues Modell für die spezifische Signaltransduktion durch akustische Pulse vorgeschlagen.

Besonders interessant für zukünftige Untersuchungen ist, ob die pH-Anregung von Grenzflächen durch Enzyme bewerkstelligt werden kann und ob sich die Pulse auch in natürlichen Systemen nachweisen lassen. Ein spannendes Forschungsobjekt hierfür ist der synaptische Spalt. Er unterliegt schnellen lokalen pH-Änderungen durch die Acetylcholinesterase. Daher ergibt sich die Frage, ob die Nervenreizleitung eventuell durch die Ansäuerung des Spalts induziert wird und falls ja, ob die propagierenden Aktionspotentiale nur eine spezielle Form von akustischen Pulsen sind.

6.3. Einfluss dynamischer Zustandsänderungen auf Enzyme

Der letzte Teil der Arbeit war der Frage gewidmet, ob die Pulse einen Effekt auf membran-gebundene Enzyme besitzen und folglich, ob die akustischen Pulse tatsächlich zur Signaltransduktion eingesetzt werden können. Dafür wurden die Enzyme Acetylcholinesterase und Phospholipase A₂ verwendet. Der Substratabbau durch die Acetylcholinesterase konnte gleichzeitig mit der Pulsausbreitung anhand eines kolorimetrischen Nachweises verfolgt werden. Wie die Ergebnisse eindeutig belegen, führt die Interaktion der pH-induzierten Pulse mit den Enzymen zu einer (biphasischen) Änderung der Enzymaktivität. Während die Grenzschicht lokal durch den Puls expandiert wird, spaltet das Enzym bis zu neunmal mehr Substratmoleküle pro Sekunde als zuvor. In der nachfolgenden Kondensation der Lipidmonolage zurück ins Gleichgewicht stoppt die Katalyse hingegen fast vollständig. Eine Möglichkeit um dieses Verhalten zu erklären, stellen die durch die katalytische Reaktion zusätzlich frei werdenden Protonen dar. Diese Protonen addieren sich zu den durch den Puls freigesetzten Protonen. In der Relaxationsphase liegt somit ein lokaler Protonenüberschuss an der Grenzschicht vor

6. Zusammenfassung und Ausblick

und die Katalyse wird gehemmt.

Die Phospholipase A₂ wird ebenfalls von den Pulsen beeinflusst. In diesem Fall bildet die Lipidmonolage nicht nur die Grenzschicht, sondern ist zusätzlich noch Substrat und Reaktionsnachweis in einem. Im Gleichgewicht führt der Abbau der Lipidmonolage durch das Enzym zu einem linearen Abfall des Lateraldrucks. Durch die Pulse verzögert sich dagegen der Abbau der Schicht. Die Enzyme werden somit durch den Puls ausgebremst.

Die betrachteten Enzym-Puls-Wechselwirkungen verdeutlichen, dass die Pulse tatsächlich als Mittel für die Signaltransduktion in Zellen in Frage kommen. Zukünftige Experimente könnten langfristig darauf abzielen Puls-Protein-Wechselwirkungen direkt in Zellen nachzuweisen. Eine mittelfristige Alternative wäre die „Imitation“ dieser natürlichen Systeme. So ist beispielsweise die Funktion von Mikrodomänen seit einigen Jahren ein häufig diskutiertes Forschungsthema. Diese könnten in Anbetracht der gewonnenen Erkenntnisse ein Instrument der Zellen sein, um Puls-Protein-Wechselwirkungen spezifisch zu steuern. Diese Hypothese könnte beispielsweise anhand von Lipidmischungen auf einer Filmwaage nachgestellt und überprüft werden. Trotz alledem bleibt die Frage wie bzw. weshalb sich biologische Membranen so einstellen sollten, dass sie sensitiv auf Zustandsänderungen reagieren. Einen möglichen Erklärungsansatz hierzu liefert die Kopplung von Zustand und enzymatischer Aktivität, welche nach Schneider erwarten lässt, dass sich Systeme in Richtung hoher Suszeptibilitäten bzw. Fluktuationen („Phasenumwandlungen“) adaptieren [186].

6.4. Schlussbemerkung

Das Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass der Physik eine tragende Rolle für biochemische Vorgänge an Grenzschichten zukommt. Grenzschichten bilden eigenständige thermodynamische Systeme, die weitgehend entkoppelt vom dreidimensionalen Bulk sind. Demzufolge kann ihr Zustand bzw. dessen Änderung mit Hilfe eines eigenen Entropiepotentials beschrieben werden. Im Falle, dass Enzyme Teil der Grenzschicht sind, wird die Reaktionskoordinate der katalysierten Reaktion ξ zu einer Variablen der Entropie ($S(n_1, n_2, \dots, \xi)$). Aufgrund der thermodynamischen Kopplung aller Observablen, nimmt die Enzymaktivität genau dann ein Maximum an, wenn das Gesamtsystem maximal fluktuiert. Da diese „kritischen“ Bereiche nur sehr selten auftreten, korreliert die hohe Spezifität dieses Zustands mit der großen Rate. Folglich kommt dem Zustand des Gesamtsystems eine regulative Funktion zu.

Gleichzeitig müssen die quasi-zweidimensionalen Systeme, in Analogie zum Schall in 3D, dynamische Prozesse erlauben. Lokale Störungen des Gleichgewichts führen, wie hier experimentell bestätigt, zu propagierenden Pulsen. Diese stellen wiederum eine kurzzeitige Zustandsänderung dar und müssen somit die Funktion gebundener Proteine beeinflussen. Offen bleibt bisher, ob Proteine ebenfalls Pulse auslösen können. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, so ergäbe sich die zweidimensionale Signaltransduktion in biologischen Grenzschichten

6.4. Schlussbemerkung

als reine Konsequenz des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik.

Es bleibt spannend, welche überraschenden Eigenschaften und Funktionen Grenzschichten noch bergen und wie die Physik diese kontrolliert.

A. Anhang

A.1. Referenzmessungen zum Pyrogallol-Assay

Die Autokatalyse des Pyrogallols führt dazu, dass die Intensität während der 20 minütigen Messung um etwa zwei Prozent abnimmt (siehe Abbildung A.1a). Sind dagegen Enzyme vorhanden, so ändert sich die Intensität im selben Zeitraum deutlich stärker (um mehr als 20 % vgl. Abbildung A.1b). Von daher kann der Einfluss der Autokatalyse auf die Messungen vernachlässigt werden. Die Messung in Abbildung A.1b wird bei einem festen Lateraldruck von 15 mN/m durchgeführt und der Abbau des Pyrogallols spektrometrisch aufgezeichnet. Wie nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz zu erwarten, nimmt die Transmission exponentiell mit der Konzentration des Produkts ab. D. h. die Aktivität ist näherungsweise konstant.

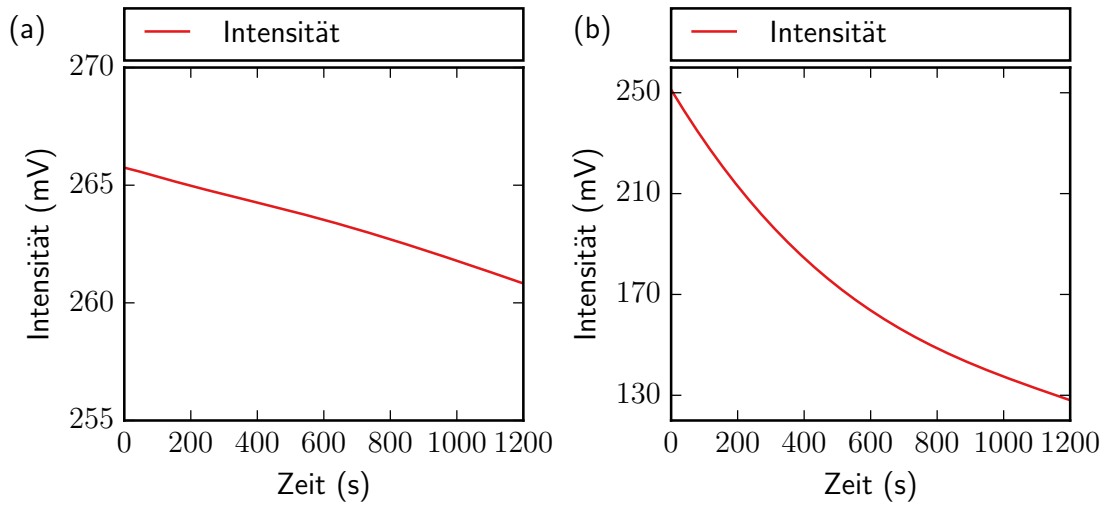


Abbildung A.1.: Referenzmessungen mit dem Pyrogallol-Assay: **(a)** Die Autokatalyse des Substrats führt in einem Zeitraum von 20 Minuten zu einer Intensitätsänderung von ca. 2%. Dieser Wert ist über einen Faktor 10 kleiner, als bei der Anwesenheit von Enzymen. Von daher kann der Einfluss der Autokatalyse auf die Messkurven vernachlässigt werden. **(b)** Typische Intensitätsmessung für eine aktive Katalasemonolage bei festem Lateraldruck (15 mN/m). Die Intensität fällt exponentiell ab. Folglich ist die Aktivität der Enzyme bei festem Lateraldruck näherungsweise konstant (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, pH 6,9, 0,1 M H₂O₂, 5 mM Pyrogallol).

A.2. Einbau der Meerrettichperoxidase in eine DPPG-Monolage

Um nachzuweisen, dass sich die Meerrettichperoxidase in Lipidschichten einbaut, wird sie auf eine DPPG-Monolage zugegeben. Dies induziert einen irreversiblen Anstieg des Lateraldrucks (siehe Abbildung A.2). Demzufolge bindet das Enzym an die Grenzschicht und kann daher als Teil dieses thermodynamischen Systems beschrieben werden.

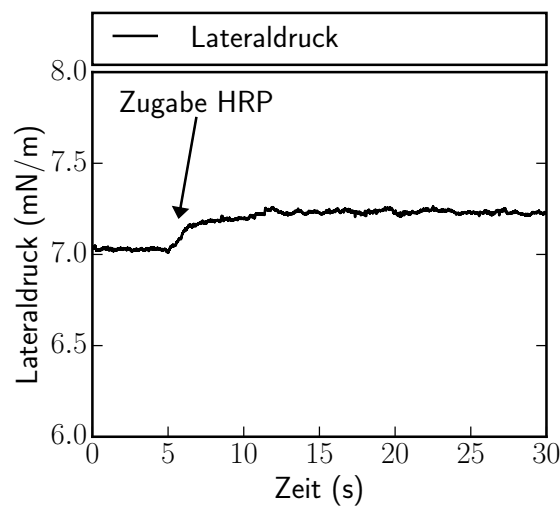


Abbildung A.2.: Einbau von HRP in eine DPPG-Monolage: Die Zugabe von 5 μ l HRP-Lösung (10 mg/ml) auf eine DPPG Monolage führt zu einem irreversiblen Druckanstieg von ca. 0,1 mN/m. Daraus kann gefolgert werden, dass zumindest ein Teil der Enzyme an die DPPG-Monolage bindet (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, pH 7,0).

A.3. Zusammenhang zwischen der Aktivität und den Fluktuationen der Acetylcholinesterase

Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie werden die Höhenfluktuationen von einzelnen Acetylcholinesterase-Molekülen während der Katalyse auf einer Mica-Oberfläche pH-abhängig untersucht. Die mittleren Fluktuationen und die zugehörige Standardabweichung sind in Abbildung A.3 gegen die Aktivität der Enzyme bei verschiedenen pH-Werten aufgetragen. Tendenziell zeigen beide einen ähnlichen Verlauf, aber die große Standardabweichung lässt leider keine definitive Aussage zu. Details zur Messung und zur Auswertung finden sich in [187].

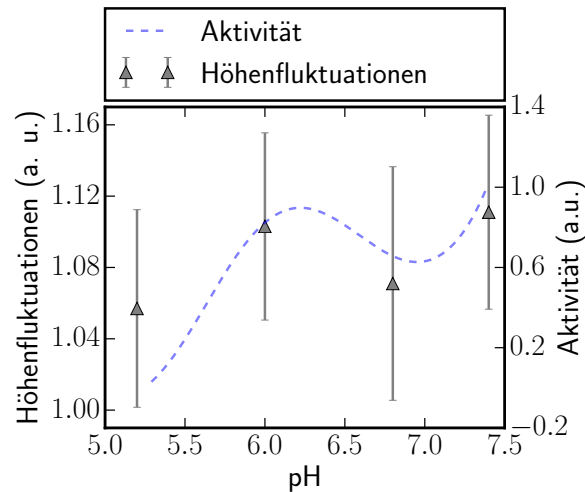


Abbildung A.3.: Aktivität und Höhenfluktuationen der Acetylcholinesterase bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich.

A.4. Referenzmessungen zur Pulsanregung

Um auszuschließen, dass die Anregung mit HCl oder CH₃COOH zu Artefakten bei der Druckmessung führen, werden Referenzmessungen auf einer reinen Wasseroberfläche durchgeführt (siehe Abbildung A.4a). Zugleich wird überprüft ob das Trägergas N₂ selbst schon einen Effekt auf die reine Wasserschicht und/oder auf Lipidmonolagen besitzt (siehe Abbildung A.4b). Wie eindeutig zu erkennen ist, kann aber in keinem der Fälle ein Einfluss auf den Lateraldruck nachgewiesen werden.

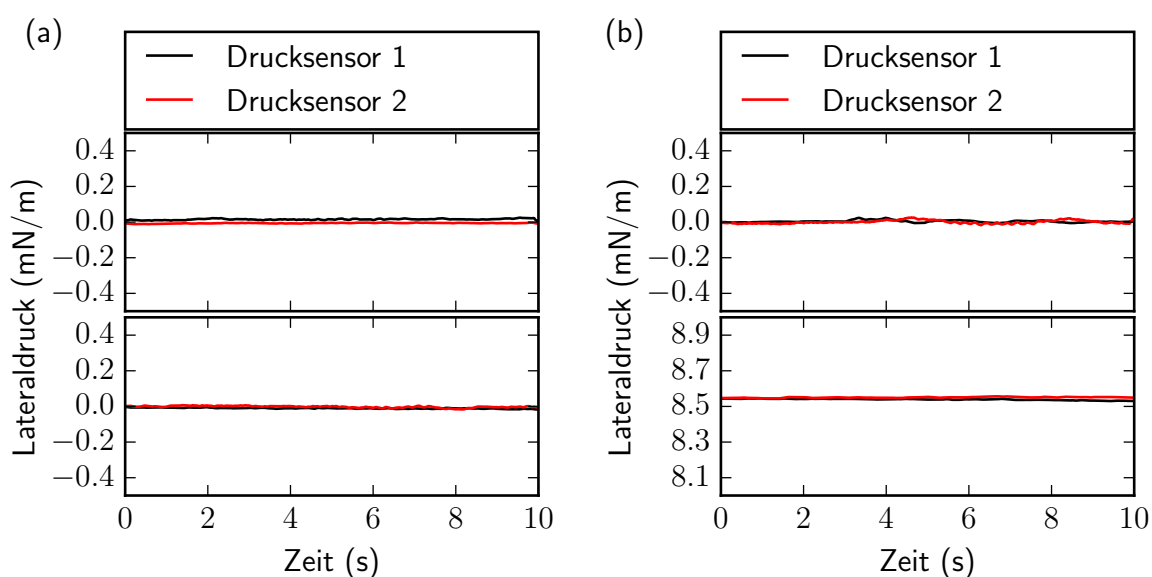


Abbildung A.4.: Referenzmessungen zur Säureanregung von Lipidmonolagen: **(a)** Zugabe von HCl (oben) und CH₃COOH (unten) mittels der Gasanregung auf eine reine Wasserschicht (Anregung nach 3 s). Der Lateraldruck wird dadurch nicht beeinflusst. **(b)** Stickstoffanregung einer reinen Wasserschicht (oben) und einer DMPS-Monolage (Anregung nach 3 s). Auch hier ist kein Effekt nachweisbar (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, pH 7,0, 0,3 bar, 36%ige Salzsäure, 100%ige Essigsäure, Druckmessung im Abstand von 0,2 m).

A.5. HCl- und CO₂-Anregung von Grenzflächen

Starke Anregungen mit Salzsäure führen zu zeitlich langgestreckten Relaxationsphasen der Grenzschicht (siehe Abbildung A.5a). Die Relaxationszeit ist durch die Diffusion der Protonen und die Konzentration an Puffermolekülen bestimmt. Erst wenn der lokale pH-Wert wieder seinen Gleichgewichtswert erreicht, geht der Lateraldruck auf seinen Anfangswert zurück.

Im Gegensatz dazu ist die extrem lange Relaxationszeit von CO₂-induzierten Pulsen auf die langsame Umwandlung von CO₂ selbst zurückzuführen (siehe Abbildung A.5b). Während die Grenzschicht bereits relaxiert, reagiert an der Anregungsstelle weiterhin CO₂ zur einfach dissoziierten Kohlensäure und erniedrigt damit den Lateraldruck. Aus dem Fit der Relaxationsphase von fünf unabhängigen Messungen ergibt sich als durchschnittliche Umwandlungsrate von CO₂: $k = (0,038 \pm 0,005) \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert passt hervorragend zu Literaturdaten ($\sim 0,037 \text{ s}^{-1}$) [133].

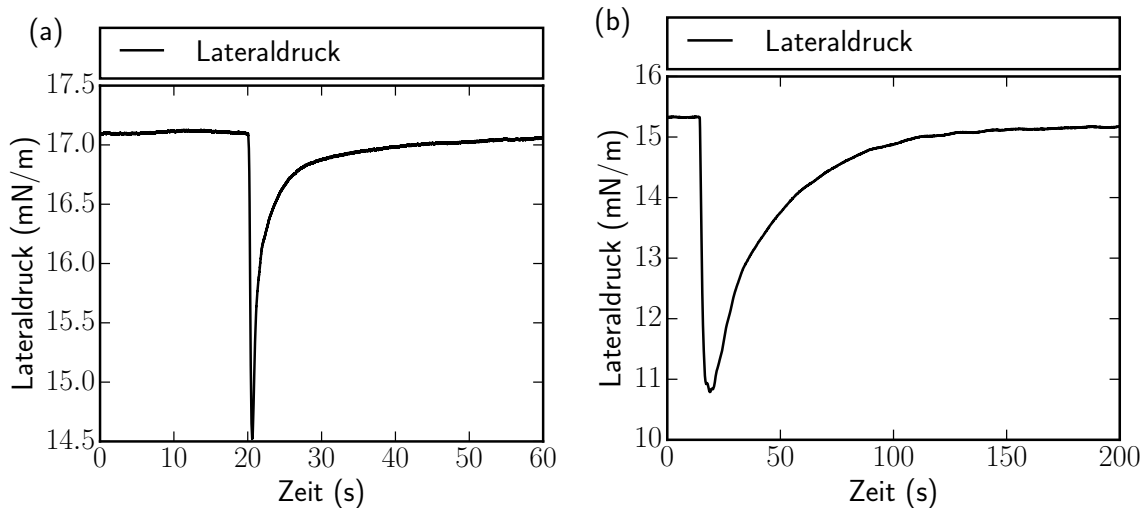


Abbildung A.5.: Säureanregungen einer DMPS-Monolage: **(a)** Starke HCl-Anregungen ziehen lange Relaxationszeiten der Grenzschicht nach sich. Diese werden durch die Diffusion der Protonen und die Pufferkonzentration in der Subphase bestimmt (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, 0,5 bar HCl-Anregung). **(b)** Die lange Relaxationszeit von CO₂-induzierten Pulsen ist durch die Umwandlungsrate der CO₂-Moleküle vorgegeben (10 mM NaCl, 0,1 mM Phosphatpuffer, 20 °C, 0,5 bar CO₂-Anregung).

A.6. Weitere Kollisionsmessungen

Die Kollision von pH-induzierten Pulsen führt zu einer linearen Überlagerung. Dieser Effekt tritt in der flüssig-kondensierten Phase der DMPS-Monolage ebenso auf, wie in der flüssig-expandierten Phase bei pH 5 (siehe Abbildung A.6).

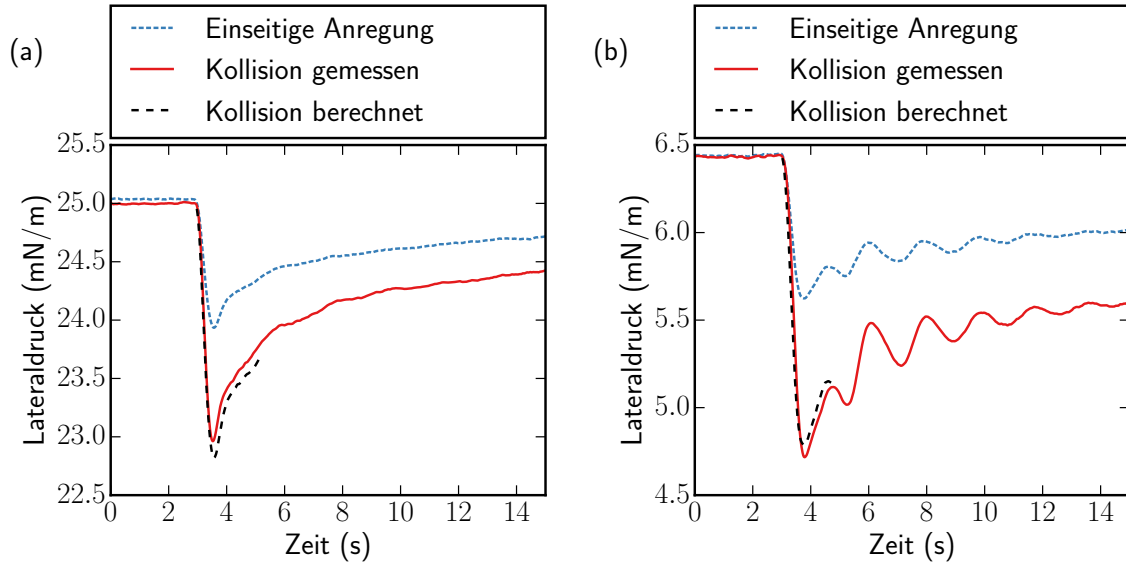


Abbildung A.6.: Kollision von Pulsen in einer DMPS-Monolage: Die berechnete Kollisionskurve für eine lineare Überlagerung stimmt sehr gut mit der gemessenen Pulsollision überein. In (a) ist dies anhand eines Experiments in der flüssig-kondensierten Phase einer DMPS-Monoschicht veranschaulicht (pH 7) und in (b) für den Fall einer flüssig-expandierten Phase bei pH 5 (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 20 °C, 0,5 bar HCl-Anregung).

A.7. Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals I_V vom Lateraldruck und pH-Wert der Subphase

Wie Abbildung A.7 zeigt, hängt das gemessene Intensitätsverhältnis des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green 488 ($I_V = \frac{I_{535\text{ nm}}}{I_{605\text{ nm}}}$) in einer DMPS-Monolage deutlich stärker vom pH-Wert der Subphase, als vom Lateraldruck der Grenzschicht, ab. Im Bereich von etwa 5 bis 15 mN/m ist I_V bei festem pH näherungsweise konstant. In diesem Lateraldruckbereich reagiert I_V praktisch nur auf pH-Änderungen.

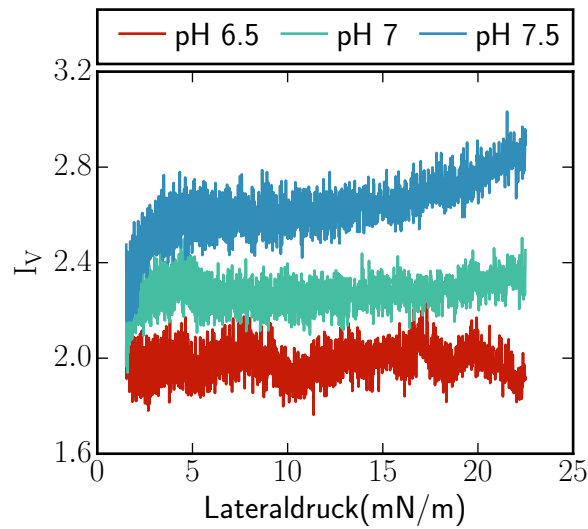


Abbildung A.7.: Zusammenhang zwischen Lateraldruck, pH-Wert und der Fluoreszenz von Oregon Green 488: I_V zeigt eine starke pH-Abhängigkeit, während der Lateraldruck nur bei sehr niedrigen (<5 mN/m) bzw. hohen Werten (>15 mN/m) einen merklichen Effekt auf I_V besitzt (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 20 °C).

A.8. Oberflächenpotentialpulse

Bei stärkeren Anregungen und/oder einer niedrigeren Pufferkonzentration können Pulse mit Amplituden $>100\text{ mV}$ ausgelöst werden (siehe exemplarisch Abbildung A.8). Dies führt folglich zu einer starken Änderung des elektrischen Feldes über die Grenzschicht in der Größenordnung von 10^5 V/m . Viele Proteine verfügen über Dipolmomente und werden daher mit Sicherheit mit dem Puls interagieren.

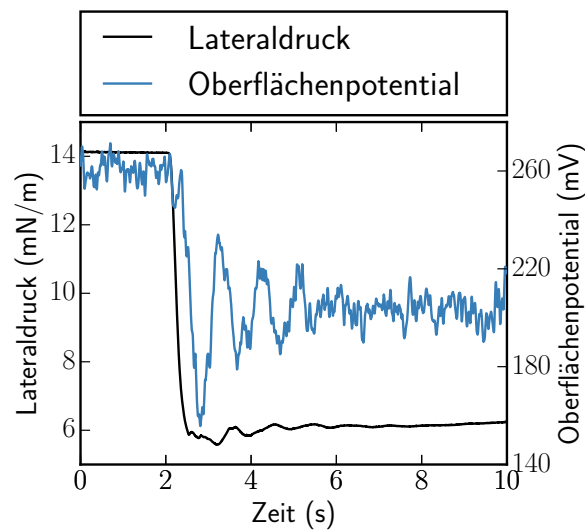


Abbildung A.8.: Mit dem verwendeten Aufbau können durch stärkere Anregungen, niedrigere Pufferkonzentrationen und/oder kleinere Systemgrößen Oberflächenpotentialpulse mit Amplituden von über 100 mV erregt werden (10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer, pH 7, 20°C , 1,0 bar).

A.9. Aktivität der Acetylcholinesterase im isothermen Fall

Bei isothermer Kompression bzw. Expansion einer DMPS-Monolage mit inkorporierter Acetylcholinesterase ist die Enzymaktivität annähernd konstant (siehe Abbildung A.9). Dies ist an der näherungsweise linearen Intensitätsabnahme der beiden Graphen zu erkennen. Demnach kann die beobachtete biphasische Enzymaktivität während eines Pulses nicht durch isotherme Messungen erklärt werden.

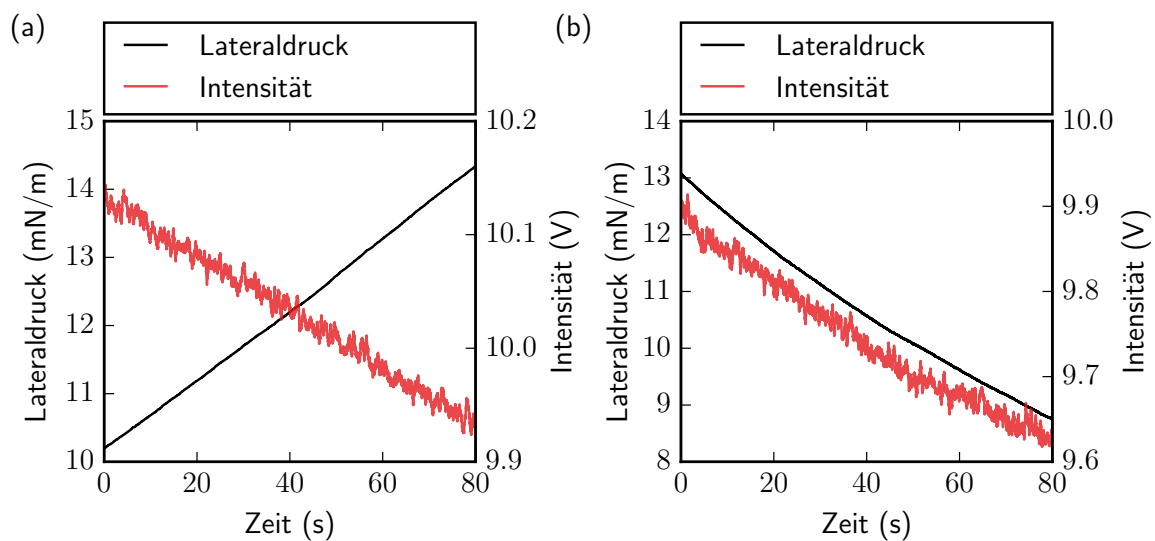


Abbildung A.9.: Aktivität der Acetylcholinesterase bei isothermer Zustandsänderung: Als Teil einer DMPS-Monoschicht werden die Enzyme quasi-statisch komprimiert (Fall (a)) bzw. expandiert (Fall (b)). In beiden Fällen nimmt die Intensität in erster Näherung linear ab, d. h. die Aktivität der Acetylcholinesterase ist konstant. Folglich kann die pulsinduzierte biphasische Katalyserate der Enzyme nicht durch quasi-statische Prozesse beschrieben werden (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 2 mM Acetylthiocholin, 2 mM DTNB, pH 7, 20 °C).

A.10. Acetylcholinesterase-CO₂-Puls-Wechselwirkung

Die CO₂-induzierten Pulse führen zu einer klaren biphasischen Enzymaktivität. Während der Expansionsfront nimmt die katalytische Rate stark zu, was durch den rapiden Intensitätsabfall erkennbar wird. In der Relaxationsphase bauen die Enzyme hingegen kaum mehr Substratmoleküle ab.

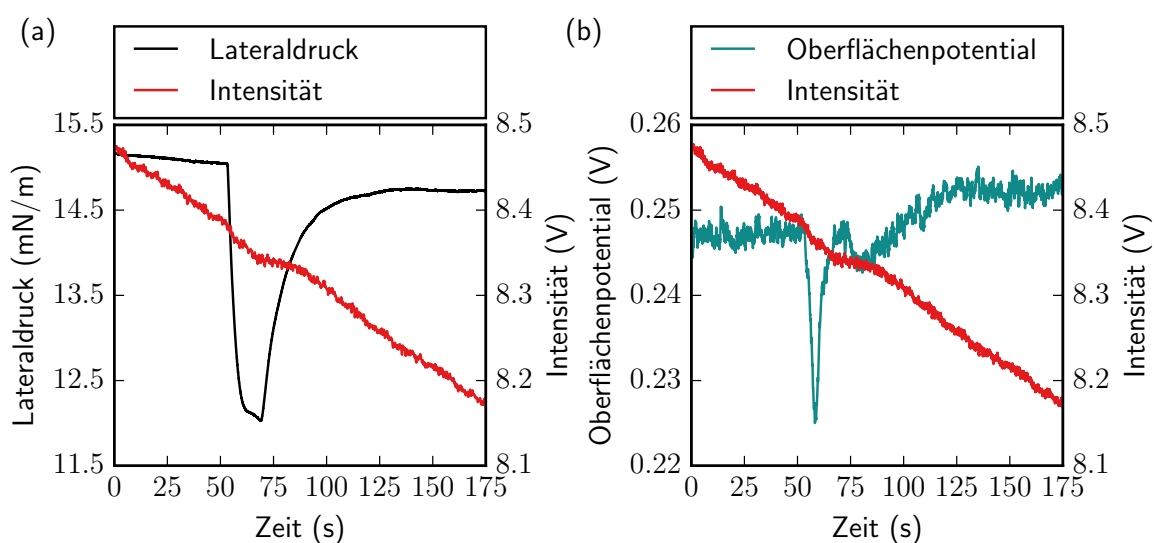


Abbildung A.10.: Acetylcholinesterase-CO₂-Puls-Wechselwirkung: (a) Das Intensitätssignal weist auch bei dieser CO₂-Anregung einen biphasischen Verlauf auf. Noch besser als mit dem Drucksignal korreliert die Aktivität der Enzyme aber wiederum mit dem gemessenen Oberflächenpotential (siehe (b)) (10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, 25 °C, 2 mM Acetylthiocholin, 2 mM DTNB, Anregung 15 s).

A.11. Acetylcholinesterase-Hexan-Puls-Wechselwirkung

Während der Ausbreitung der Hexan-induzierten Pulse nimmt die Enzymaktivität kurzzeitig stark ab. Dies wird durch den quasi horizontalen Verlauf des Intensitätssignals in Abbildung A.11 deutlich. Sobald das System wieder ins Gleichgewicht gelangt, steigt auch die Aktivität auf ihren früheren Wert an. Das Oberflächenpotential in diesem Beispiel kehrt allerdings nicht auf seinen vorherigen Gleichgewichtswert zurück. Dies ist auf eine konvektive Verschiebung der Monolage zurückzuführen und nicht auf einen Pulseffekt.

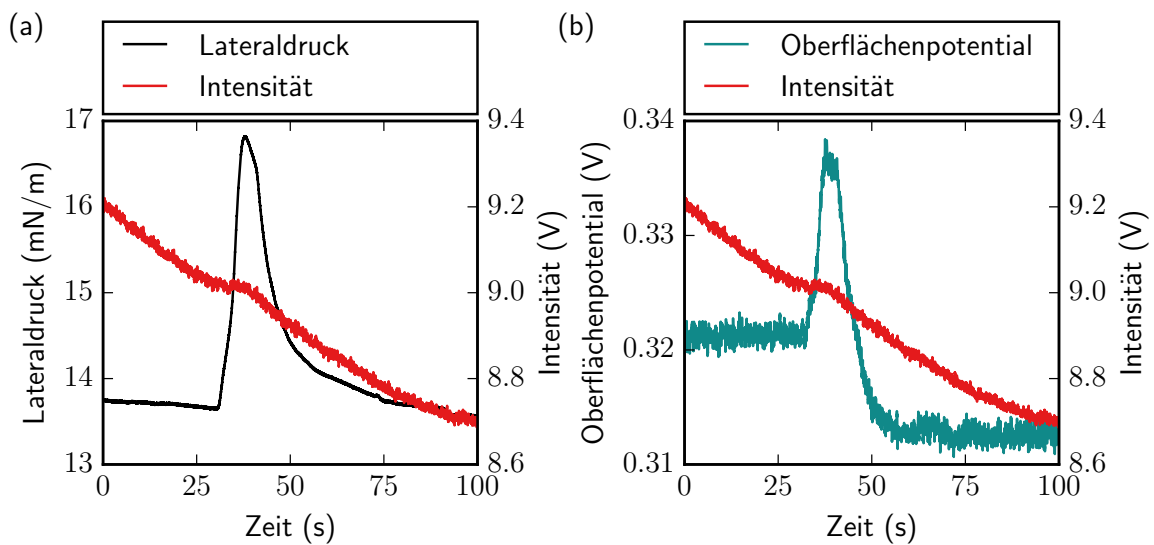


Abbildung A.11.: Acetylcholinesterase-Hexan-Puls-Wechselwirkung: In (a) ist ein Experiment zum Effekt der Kondensationspulse auf die Enzyme dargestellt. Die Intensität sinkt während des Pulses deutlich langsamer ab als zuvor. Der Puls hemmt also kurzzeitig die Enzyme. In (b) ist zusätzlich noch das Oberflächenpotential aufgetragen (10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, 25 °C, 2 mM Acetylthiocholin, 2 mM DTNB, Anregung 15 s).

B. Methodische Details

Die Experimente auf der Filmwaage werden nach folgendem Ablauf durchgeführt:

1. Abreiben des Trog mit Isopropanol.
2. Falls die Kelvin-Sonde zum Einsatz kommt, wird die Referenzelektroden-Platte mit Ethanol, Isopropanol und Reinstwasser gereinigt und in die Subphase eingelegt. Die Kelvin-Sonde selbst wird nur mit Isopropanol abgespült.
3. Falls zusätzliche Barrieren für die Experimente benötigt werden, werden diese ebenfalls mit Ethanol, Isopropanol und Reinstwasser gereinigt und im Trog positioniert.
4. Nun werden die Wilhelmy-Plättchen an die beiden Kraftsensoren eingehängt.
5. Anschließend wird der Trog mit Reinstwasser gefüllt und das Wasser wieder abgesaugt. Dieser Vorgang ist dreimal zu wiederholen damit eine saubere Filmwaage gewährleistet werden kann.
6. Danach wird die vorbereitete Versuchslösung (z. B. eine Pufferlösung) in den Trog gegeben. Es ist zu empfehlen auch hier wieder einen Teil der Lösung abzusaugen (am besten direkt von der Oberfläche), um Verunreinigungen der Wasser-Luft-Grenzfläche vorzubeugen.
7. Die Kelvin-Sonde wird nun auf ca. 1 mm Abstand zur Wasseroberfläche heruntergefahren.

Damit sind die Vorbereitungen abgeschlossen. Je nach Experiment variiert ab diesem Zeitpunkt die weitere Vorgehensweise. Deshalb werden die experimentellen Details nach den zugehörigen Kapiteln aufgetrennt:

Regulation von Enzymaktivität über den Zustand der Grenzschicht

Katalase

1. Mit der von Sigma-Aldrich erworbenen Katalase (EC Number 232-577-1) wird eine Enzymlösung mit 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Phosphatpuffer bei einem pH von 7,4 hergestellt und auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml eingestellt.

B. Methodische Details

2. Anschließend werden 7,5 μl der Enzymlösung auf die Wasseroberfläche der Filmwaage gegeben (100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,9, Fläche 300 cm^2).
3. Nachdem kein weiterer Druckanstieg festgestellt werden kann (nach ca. 1 h), wird die Reaktion durch die Zugabe von Pyrogallol (Endkonzentration 5 mM) und H_2O_2 (Endkonzentration 0,1 M) gestartet.
4. Die quasi-statischen Messungen werden bei verschiedenen Temperaturen mit Kompressions- bzw. Expansionsgeschwindigkeiten von 5 – 20 cm^2/min durchgeführt.
5. Die Aktivität der Enzyme kann mit dem kolorimetrischen Assay bei einer Wellenlänge von ca. 410 nm bestimmt werden.

Meerrettichperoxidase

1. Die Meerrettichperoxidase stammt von Sigma-Aldrich (EC Number 232-668-6) und wird in einer Lösung mit 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Phosphatpuffer bei einem pH von 7,4 auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml eingestellt.
2. Durch die Zugabe von etwa 5 μl einer Lipidlösung (DMPS, DPPG; $c = 10 \text{ mg/ml}$) auf die Oberfläche der Subphase bestehend aus 100 mM NaCl und 10 mM Phosphatpuffer (Fläche $\sim 100 \text{ cm}^2$), wird im linken Teil der Filmwaage eine Lipidmonolage hergestellt (Aufbau siehe Abbildung 3.7).
3. Anschließend werden dort bei einem Druck von ca. 10 mN/m 10 μl der Enzymlösung zugegeben und verteilt.
4. Nach 15 Minuten Einwirkzeit werden die Barrieren bei gleichbleibendem Abstand zur Filmwaagenmitte gefahren.
5. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Pyrogallol (Endkonzentration 5 mM) und H_2O_2 (Endkonzentration 0,1 M) gestartet.
6. Die Isothermen werden bei verschiedenen pH-Werten in der Subphase sowie verschiedenen Temperaturen mit Kompressions- bzw. Expansionsgeschwindigkeiten von 1 – 20 cm^2/min aufgezeichnet.
7. Die Aktivität der Enzyme kann mit dem kolorimetrischen Assay bei einer Wellenlänge von ca. 410 nm bestimmt werden.

Erregung und Ausbreitung von Pulsen in Grenzschichten

1. Für die Pulsexperimente wird durch die Zugabe von ca. 5 μl einer Lipidlösung (DMPS, DPPG, DPPC; $c = 10 \text{ mg/ml}$) eine Monolage auf die Wasseroberfläche gespreitet (Fläche $\approx 300 \text{ cm}^2$).

2. Bei den HCl-induzierten und den temperaturinduzierten Pulsen wird eine Versuchslösung mit der folgenden Zusammensetzung verwendet: 100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer.
3. Für die CO₂-induzierten Pulse wurde dagegen eine Versuchslösung mit der folgenden Zusammensetzung eingesetzt: 10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer.
4. Für die Pulsanregung werden 50 ml N₂ mit einem Druck von 0,02-0,5 bar durch die Gasphase einer 32%igen Salzsäure bzw. einer 100%igen Essigsäure Lösung geleitet (Setup siehe Abbildung 4.2).
5. Im Fall der CO₂-Anregung wird hingegen kein Trägergas verwendet. Zur Anregung strömen 50 ml des reinen Kohlenstoffdioxids bei Drücken zwischen 0,1-1,0 bar auf die Lipidmonolage aus (Setup siehe Abbildung 4.2).

Puls-Enzym-Wechselwirkung

Die Lipidmonolage bei den Enzym-Puls-Experimenten wird durch die Zugabe von ca. 5 µl einer DMPS-Lösung ($c = 10 \text{ mg/ml}$) auf die Wasseroberfläche gebildet (Fläche ca. 200 cm^2).

Acetylcholinesterase

1. Auf die Lipidmonolage werden bei einem Druck von etwa 10 mN/m im linken Teil der Monoschicht 3 µl einer Acetylcholinesterase-Lösung ($c = 68 \text{ µg/ml}$) zutitriert (Aufbau siehe Abbildung 5.1). Die verwendete AChE stammt aus einem Zitterrochen (*torpedo californica*) und wurde am Lehrstuhl von Prof. Silman am Weizmann Institut aufgereinigt.
2. Bei der HCl-Anregung besteht die Subphase aus 100 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 2 mM DTNB und 2 mM Acetylthiocholin. Die Anregung erfolgt mit 0,5 bar.
3. Für die CO₂-Anregung wird dagegen folgende Versuchslösung verwendet: 10 mM NaCl, 1 mM Phosphatpuffer, 2 mM DTNB und 2 mM Acetylthiocholin. Zur Anregung wird mit Hilfe eines Massendurchflussreglers ein CO₂-Fluss von 150 ml/min eingestellt und für 15 s auf die Monoschicht geleitet.
4. Für die Anregung der Kondensationspulse wird ein N₂-Fluss von 150 ml/min eingestellt und für 15 s durch die Gasflasche einer 100%igen Hexanlösung geleitet. Die Zusammensetzung der Subphase entspricht der CO₂-Anregung.
5. Die Aktivität der Enzyme kann mit dem kolorimetrischen Assay bei einer Wellenlänge von ca. 410 nm bestimmt werden.

B. Methodische Details

Phospholipase A₂

1. Für die PLA₂-Puls-Experimente wird die Phospholipase A₂ von Sigma-Aldrich eingesetzt (EC number 232-637-7).
2. Bei einem festen Lateraldruck werden im linken Teil der Monoschicht 5 µl der PLA₂-Lösung ($c = 67 \text{ mg/ml}$) zugegeben (Aufbau siehe Abbildung 5.1).
3. Die CO₂-Anregung erfolgt mit 0,5 bar bei einem Volumen von 50 ml.
4. Die Aktivität der Enzyme kann aus der Abnahme des Lateraldrucks berechnet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Y. N. Harari, *Sapiens: a brief history of humankind*. New York: Harper, first u.s. ed., 2015.
- [2] S. Herculano-Houzel, “The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain,” *Frontiers in human neuroscience*, vol. 3, p. 31, jan 2009.
- [3] O. Mouritsen, *Life – as a matter of fat: the emerging science of lipidomics*. Springer, Berlin, Germany, 1 ed., 2005.
- [4] H. K. Kimelberg and D. Papahadjopoulos, “Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na⁺ + K⁺)-stimulated adenosine triphosphatase,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 249, no. 4, pp. 1071–1080, 1974.
- [5] G. Lenaz, A. M. Sechi, G. Parenti-Castelli, L. Landi, and E. Bertoli, “Activation energies of different mitochondrial enzymes: breaks in Arrhenius plots of membrane-bound enzymes occur at different temperatures,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 49, no. 2, pp. 536–542, 1972.
- [6] J. Griesbauer, a. Wixforth, and M. F. Schneider, “Wave propagation in lipid monolayers,” *Biophysical journal*, vol. 97, pp. 2710–2716, nov 2009.
- [7] J. Griesbauer, S. Bössinger, A. Wixforth, and M. F. Schneider, “Propagation of 2D Pressure Pulses in Lipid Monolayers and Its Possible Implications for Biology,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 108, no. 19, p. 198103, 2012.
- [8] R. Hooke, *Micrographia: Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*. 1665.
- [9] S. J. Singer and G. L. Nicolson, “The fluid mosaic model of the structure of cell membranes,” *Science (New York, N)*, vol. 175, no. 23, pp. 720–731, 1972.
- [10] E. Sackmann and R. Merkel, *Lehrbuch der Biophysik*. Master, Weinheim: Wiley-VCH, 2. nachdru ed., 2012.
- [11] E. Overton, “Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie,” *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich*, vol. 44, no. 1-2, pp. 88–135, 1899.

- [12] E. Gorter and F. Grendel, "ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 41, no. 4, pp. 439–443, 1925.
- [13] E. N. HARVEY and J. F. DANIELLI, "PROPERTIES OF THE CELL SURFACE," *Biological Reviews*, vol. 13, pp. 319–341, oct 1938.
- [14] T. Heimburg, *Thermal biophysics of membranes*. Tutorials in biophysics, Weinheim: WILEY-VCH, 2007.
- [15] G. Vereb, J. Szöllosi, J. Matkó, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Mátyus, T. a. Waldmann, and S. Damjanovich, "Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, pp. 8053–8, jul 2003.
- [16] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. And Walter, *Molecular Biology of the Cell*, vol. 54. 2008.
- [17] G. Cevc, *Phospholipids handbook*. New York etc.: Dekker, 1993.
- [18] D. Marsh, *Handbook of lipid bilayers*. Boca Raton FL.: CRC Press Taylor & Francis Group, 2nd ed. ed., 2013.
- [19] M. A. Casadei, P. Mañas, G. Niven, E. Needs, and B. M. Mackey, "Role of membrane fluidity in pressure resistance of Escherichia coli NCTC 8164," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 12, pp. 5965–5972, 2002.
- [20] R. N. McElhaney and K. A. Souza, "The relationship between environmental temperature, cell growth and the fluidity and physical state of the membrane lipids in Bacillus stearothermophilus," *Biochim Biophys Acta*, vol. 443, no. 3, pp. 348–359, 1976.
- [21] D. L. Melchior and J. M. Steim, "Control of fatty acid composition of Acholeplasma laidlawii membranes.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 466, no. 1, pp. 148–159, 1977.
- [22] A. R. Cossins, "Adaptation of biological membranes to temperature. The effect of temperature acclimation of goldfish upon the viscosity of synaptosomal membranes.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 470, no. 3, pp. 395–411, 1977.
- [23] A. R. Cossins and A. G. Macdonald, "The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold.," *Journal of bioenergetics and bio-membranes*, vol. 21, no. 1, pp. 115–135, 1989.
- [24] S. Nuschele, *The Role of Interfaces in Enzyme Activity and Cell Adaptation*. PhD thesis, Universität Augsburg, Augsburg, 2010.

- [25] C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, "Structure of hen egg-white lysozyme, a three dimensional fourier synthesis at 2~Ångstroms resolution," *Nature*, vol. 206, no. 4986, pp. 757–761, 1965.
- [26] B. P. English, W. Min, O. Am van, K. T. Lee, G. Luo, H. Sun, B. J. Cherayil, S. C. Kou, and X. S. Xie, "Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited," *Nature chemical biology*, vol. 2, no. 2, pp. 87–94, 2006.
- [27] B. Gavish, E. Gratton, and C. J. Hardy, "Adiabatic compressibility of globular proteins.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, no. 3, pp. 750–754, 1983.
- [28] K. Gekko and Y. Hasegawa, "Compressibility-Structure Relationships of Globular Proteins," *Biochemistry*, vol. 25, pp. 6563–6571, 1986.
- [29] K. Gekko and Y. Hasegawa, "Compressibility-structure relationship of globular proteins.," *Biochemistry*, vol. 25, no. 21, pp. 6563–6571, 1986.
- [30] A. Cooper, "Thermodynamic fluctuations in protein molecules.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 8, pp. 2740–2741, 1976.
- [31] A. Cooper, "Protein fluctuations and the thermodynamic uncertainty principle.," *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 44, no. 3, pp. 181–214, 1984.
- [32] A. Einstein, *Autobiographical notes*. La Salle etc.: Open Court Publishing Company, 1979.
- [33] A. Einstein, "Folgerungen aus den Capillaritätserscheinungen.," *Annalen der Physik*, vol. 309, no. 3, pp. 513–523, 1901.
- [34] B. Fichtl, *Enzyme an weichen Grenzflächen*. Diplomarbeit, Universität Augsburg, 2010.
- [35] L. Boltzmann, "Über die Beziehung zwischen dem zweiten Hauptsatz der mechanischen Wärmetheorie und der Wahrscheinlichkeitsrechnung respektive den Sätzen über das Wärmegleichgewicht," *Wiener Berichte*, vol. 76, pp. 373–435, 1877.
- [36] A. Einstein, "Theorie der Opaleszenz von homogenen Flüssigkeiten und Flüssigkeitsgemischen in der Nähe des kritischen Zustandes," *Annalen der Physik*, vol. 338, no. 16, pp. 1275–1298, 1910.
- [37] A. Einstein, "Die Theorie der Strahlung und Quanten," in *Abhandlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für angewandte physikalische Chemie*, vol. 3, ch. Zum gegenw, pp. 330–364, 1914.

- [38] L. D. Landau and E. M. Lifshitz, *Statistical physics ; 1*, vol. / by L. D. of *Course of theoretical physics*. Amsterdam u.a: Elsevier [u.a.], 3. ed. / ed., 2007.
- [39] P. Reineker, M. Schulz, and B. M. Schulz, *Statistische Physik und Thermodynamik*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 1. auflage ed., 2010.
- [40] A. Cooper, J. L. Houben, and L. Chien, eds., *The Enzyme Catalysis Process: Energetics, Mechanism, and Dynamics*, NATO ASI Series : Advanced Science Institutes Series Series A, Life sciences, (New York etc.), Plenum Press, 1989.
- [41] J. Gómez, V. J. Hilser, D. Xie, and E. Freire, “The heat capacity of proteins,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 22, no. 4, pp. 404–412, 1995.
- [42] J. M. Steinweg, S. Jagadamma, J. Frerichs, and M. A. Mayes, “Activation Energy of Extracellular Enzymes in Soils from Different Biomes,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, 2013.
- [43] H. K. Kimelberg, “ACTIVITY DUE TO LIPID FLUIDITY,” vol. 413, pp. 143–156, 1975.
- [44] D. Steppich, J. Griesbauer, T. Frommelt, W. Appelt, A. Wixforth, and M. F. Schneider, “Thermomechanic-electrical coupling in phospholipid monolayers near the critical point,” *Physical Review E*, vol. 81, no. 6, p. 61123, 2010.
- [45] J. Griesbauer, *Akustik und Dynamik von Lipid-Monolayern im Licht der Nervenreizleitung*. Phd thesis, Universität Augsburg, 2011.
- [46] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*. Amsterdam: Elsevier, 3rd ed., 2011.
- [47] I. C. Shieh and J. A. Zasadzinski, “Visualizing monolayers with a water-soluble fluorophore to quantify adsorption, desorption, and the double layer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, pp. E826–E835, feb 2015.
- [48] C. A. Helm, L. Laxhuber, M. Lösche, and H. Möhwald, “Electrostatic interactions in phospholipid membranes I: Influence of monovalent ions,” *Colloid and Polymer Science*, vol. 264, no. 1, pp. 46–55, 1986.
- [49] B. Franklin, “To William Brownrigg,” 1773.
- [50] A. Pockels, “Surface tension,” *Nature*, vol. 43, no. 1115, pp. 437–439, 1891.
- [51] A. Pockels, “Relations between the surface tension and relative contamination of water surfaces,” *Nature*, vol. 48, pp. 152–154, 1893.
- [52] A. Pockels, “On the Relative Contamination of the Water-Surface by Equal Quantities of Different Substances,” *Nature*, vol. 46, no. 1192, pp. 418–419, 1892.

- [53] G. L. Gaines, *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Interscience monographs on physical chemistry, New York: Interscience Publ., 1966.
- [54] H. Möhwald, “Phospholipid Monolayers,” in *Structure and Dynamics of Membranes* (R. Lipowsky and E. Sackmann, eds.), ch. 4, pp. 161–211, 1995.
- [55] V. Vogel and D. Möbius, “Local surface potentials and electric dipole moments of lipid monolayers: Contributions of the water/lipid and the lipid/air interfaces,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 126, no. 2, pp. 408–420, 1988.
- [56] M. Noras, “AC-Feedback Electrostatic Voltmeter Operation,” *Trek Application Note*, vol. 0803/MAN R, pp. 1–4, 2003.
- [57] B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson, and D. M. Blow, “Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin,” *Nature*, vol. 214, pp. 652–656, may 1967.
- [58] H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allewell, T. Inagami, L. N. Johnson, and F. M. Richards, “The structure of ribonuclease-S at 3.5 Å resolution,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 242, pp. 3984–3988, sep 1967.
- [59] M. Karplus and J. A. McCammon, “Molecular dynamics simulations of biomolecules,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 9, pp. 646–652, sep 2002.
- [60] Z. D. Nagel and J. P. Klinman, “A 21st century revisionist’s view at a turning point in enzymology,” *Nat Chem Biol*, vol. 5, pp. 543–550, aug 2009.
- [61] J. J. Berzelius, “Årsberättelsen om framsteg i fysik och kemi,” tech. rep., Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm, 1835.
- [62] W. Ostwald, “Nobel Lecture - On Catalysis,” 1909.
- [63] F. Schüth, “Heterogene Katalyse. Schlüsseltechnologie der chemischen Industrie,” *Chemie in unserer Zeit*, vol. 40, pp. 92–103, apr 2006.
- [64] E. Buchner, “Alkoholische Gärung ohne Hefezellen: (Vorläufige Mitteilung),” *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, vol. 30, pp. 117–124, 1897.
- [65] X. S. Xie, “Enzyme Kinetics, Past and Present,” *Science*, vol. 342, no. 6165, pp. 1457–1459, 2013.
- [66] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. New York: W. H. Freeman, 3rd revise ed., 1999.
- [67] H. Eyring, “The Activated Complex in Chemical Reactions,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 3, no. 2, p. 107, 1935.

- [68] G. Beauregard and B. D. Roufogalis, "The role of tightly bound phospholipid in the activity of erythrocyte acetylcholinesterase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 77, no. 1, pp. 211–219, 1977.
- [69] M. T. Lehto and F. J. Sharom, "PI-Specific Phospholipase C Cleavage of a Reconstituted GPI-Anchored Protein: Modulation by the Lipid Bilayer," *Biochemistry*, vol. 41, pp. 1398–1408, jan 2002.
- [70] P. Ott, "Membrane acetylcholinesterases: purification, molecular properties and interactions with amphiphilic environments," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 822, no. 3-4, pp. 375–392, 1985.
- [71] J. Kumamoto, J. K. Raison, and J. M. Lyons, "Temperature 'breaks' in Arrhenius plots: A thermodynamic consequence of a phase change," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 31, pp. 47–51, apr 1971.
- [72] J. Raison, "The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems," *Journal of bioenergetics*, vol. 4, no. 1-2, pp. 285–309, 1973.
- [73] J. K. Raison and J. M. Lyons, "Hibernation: Alteration of Mitochondrial Membranes as a Requisite for Metabolism at Low Temperature," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 68, pp. 2092–2094, sep 1971.
- [74] J. K. Raison and J. M. Lyons, "Hibernation: alteration of mitochondrial membranes as a requisite for metabolism at low temperature.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 68, no. 9, pp. 2092–2094, 1971.
- [75] J. A. F. Op Den Kamp, J. De Gier, and L. L. M. van Deenen, "Hydrolysis of phosphatidylcholine liposomes by pancreatic phospholipase A2 at the transition temperature," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 345, no. 2, pp. 253–256, 1974.
- [76] T. Hønger, K. Jørgensen, R. L. Biltonen, and O. G. Mouritsen, "Systematic Relationship between Phospholipase A2 Activity and Dynamic Lipid Bilayer Microheterogeneity," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 9003–9006, jan 1996.
- [77] M. Vandenbranden, G. De Gand, R. Brasseur, F. Defrise-Quertain, and J.-M. Ruyschaert, "Hydrolysis of phosphatidylcholine liposomes by lysosomal phospholipase A is maximal at the phase transition temperature of the lipid substrate," *Bioscience Reports*, vol. 5, pp. 477–482, jun 1985.
- [78] J. M. Holopainen, M. I. Angelova, T. Soderlund, and P. K. Kinnunen, "Macroscopic consequences of the action of phospholipase C on giant unilamellar liposomes," *Biophysical journal*, vol. 83, no. 2, pp. 932–943, 2002.

- [79] C. D. Linden, K. L. Wright, H. M. McConnell, and C. F. Fox, "Lateral phase separations in membrane lipids and the mechanism of sugar transport in *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 70, no. 8, pp. 2271–2275, 1973.
- [80] B. Wunderlich, C. Leirer, A. L. Idzko, U. F. Keyser, A. Wixforth, V. M. Myles, T. Heimburg, and M. F. Schneider, "Phase-state dependent current fluctuations in pure lipid membranes," *Biophysical journal*, vol. 96, no. 11, pp. 4592–4597, 2009.
- [81] T. Heimburg, "Lipid ion channels," *Biophysical chemistry*, vol. 150, pp. 2–22, aug 2010.
- [82] K. Kaufmann, W. Hanke, and A. Corcia, *Ion channel fluctuations in pure lipid bilayer membranes: Control by voltage*. 1989.
- [83] K. Kaufmann, *My Theory*. 2009.
- [84] A. Einstein, "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen," *Annalen der Physik*, vol. 322, no. 8, pp. 549–560, 1905.
- [85] J. A. Op den Kamp, M. T. Kauerz, and L. L. van Deenen, "Action of pancreatic phospholipase A2 on phosphatidylcholine bilayers in different physical states," *Biochim Biophys Acta*, vol. 406, no. 2, pp. 169–77, 1975.
- [86] P. Chelikani, I. Fita, and P. C. Loewen, "Diversity of structures and properties among catalases," *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, vol. 61, pp. 192–208, jan 2004.
- [87] J. M. Wood, H. Decker, H. Hartmann, B. Chavan, H. Rokos, J. D. Spencer, S. Hasse, M. J. Thornton, M. Shalbaf, R. Paus, and K. U. Schallreuter, "Senile hair graying: H2O2-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair," *The FASEB Journal*, vol. 23, pp. 2065–2075, jul 2009.
- [88] I. Fita and M. G. Rossmann, "The NADPH binding site on beef liver catalase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, pp. 1604–1608, mar 1985.
- [89] H. Tauber, "Oxidation of pyrogallol by crystalline catalase," *J. Biol. Chem.*, vol. 205, no. 1, pp. 395–400, 1953.
- [90] L. M. Shannon, E. Kay, and J. Y. Lew, "Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties," *The Journal of biological chemistry*, vol. 241, pp. 2166–2172, may 1966.

- [91] W. Nitsch and R. Maksymiwiw, “Catalase monolayers at the air/water interface I. Reversibilities and irreversibilities,” *Colloid & Polymer Science*, vol. 268, pp. 452–459, may 1990.
- [92] J. C. Skou, “Studies on the influence of the degree of unfolding and the orientation of the side chains on the activity of a surface-spread enzyme,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 31, pp. 1–10, jan 1959.
- [93] N. C. Veitch, “Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme,” *Phytochemistry*, vol. 65, pp. 249–259, feb 2004.
- [94] K. Fernandes, C. Lima, F. Lopes, and C. Collins, “Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline,” *Process Biochemistry*, vol. 39, pp. 957–962, apr 2004.
- [95] L. Edman and R. Rigler, “Memory landscapes of single-enzyme molecules,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 15, pp. 8266–8271, 2000.
- [96] L. Edman, Z. Földes-Papp, S. Wennmalm, and R. Rigler, “The fluctuating enzyme: a single molecule approach,” *Chemical Physics*, vol. 247, pp. 11–22, aug 1999.
- [97] S. Wennmalm, L. Edman, and R. Rigler, “Conformational fluctuations in single DNA molecules,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 20, pp. 10641–10646, 1997.
- [98] M. Gudmand, M. Fidorra, T. Bjørnholm, and T. Heimburg, “Diffusion and Partitioning of Fluorescent Lipid Probes in Phospholipid Monolayers,” *Biophysical Journal*, vol. 96, pp. 4598–4609, jun 2009.
- [99] G. Chwastek and P. Schwille, “A Monolayer Assay Tailored to Investigate Lipid–Protein Systems,” *ChemPhysChem*, vol. 14, pp. 1877–1881, jun 2013.
- [100] M. F. Schneider, S. Nuschele, S. Shrivastava, C. Fillafer, B. Fichtl, I. Silman, and K. Kaufmann, “From Thermodynamic States to Biological Function by Einstein’s Approach to Statistical Physics,” *Biophysical Journal*, vol. 102, p. 292a, dec 2015.
- [101] H. Brockerhoff and R. G. Jensen, *Lipolytic Enzymes*. Elsevier, 1974.
- [102] I. Silman and J. L. Sussman, “Acetylcholinesterase: how is structure related to function?,” *Chemico-biological interactions*, vol. 175, pp. 3–10, sep 2008.
- [103] B. Fichtl, S. Shrivastava, and M. F. Schneider, “Protons at the speed of sound: Predicting specific biological signaling from physics,” *Scientific Reports*, vol. 6, p. 22874, may 2016.

- [104] J. Lucassen, “Longitudinal capillary waves. Part 1.-Theory,” *Transactions of the Faraday Society*, vol. 64, no. 0, pp. 2221–2229, 1968.
- [105] J. Lucassen, “Longitudinal capillary waves. Part 2.-Experiments,” *Transactions of the Faraday Society*, vol. 64, no. 0, pp. 2230–2235, 1968.
- [106] J. Lucassen and M. Van Den Tempel, “Longitudinal waves on visco-elastic surfaces,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 41, pp. 491–498, dec 1972.
- [107] V. Vogel and D. Moebius, “Resonance of transverse capillary and longitudinal waves as a tool for monolayer investigations at the air-water interface,” *Langmuir*, vol. 5, pp. 129–133, jan 1989.
- [108] W. Budach and D. Möbius, “Detection of longitudinal waves in resonance with capillary waves at the air-water interface by energy transfer,” *Thin Solid Films*, vol. 178, pp. 61–65, nov 1989.
- [109] B. Noskov, D. Alexandrov, G. Loglio, and R. Miller, “Characterisation of adsorbed polymer film structure by dynamic surface tension and dilational elasticity,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 156, pp. 307–313, oct 1999.
- [110] M. Suzuki, D. Möbius, and R. Ahuja, “Generation and transmission of a surface pressure impulse in monolayers,” *Thin Solid Films*, vol. 138, pp. 151–156, apr 1986.
- [111] J. Teissié, M. Prats, P. Soucaille, and J. F. Tocanne, “Evidence for conduction of protons along the interface between water and a polar lipid monolayer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 32, no. 10, pp. 3217–3221, 1985.
- [112] H. Morgan, D. M. Taylor, and O. N. Oliveira, “Proton transport at the monolayer-water interface,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1062, pp. 149–56, feb 1991.
- [113] B. Gabriel and J. Teissié, “Proton long-range migration along protein monolayers and its consequences on membrane coupling,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 25, pp. 14521–14525, 1996.
- [114] M. Brändén, T. Sandén, P. Brzezinski, and J. Widengren, “Localized proton microcircuits at the biological membrane–water interface,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 52, pp. 19766–19770, 2006.
- [115] S. Serowy, S. M. Saparov, Y. N. Antonenko, W. Kozlovsky, V. Hagen, and P. Pohl, “Structural Proton Diffusion along Lipid Bilayers,” *Biophysical journal*, vol. 84, no. 2, pp. 1031–1037, 2002.

- [116] T. Sandén, L. Salomonsson, P. Brzezinski, and J. Widengren, “Surface-coupled proton exchange of a membrane-bound proton acceptor,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, pp. 4129–4134, mar 2010.
- [117] E. S. Medvedev and A. A. Stuchebrukhov, “Mechanism of long-range proton translocation along biological membranes,” *FEBS letters*, vol. 587, no. 4, pp. 345–349, 2012.
- [118] S. H. Lee and J. C. Rasaiah, “Proton transfer and the mobilities of the H^+ and OH^- ions from studies of a dissociating model for water,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 135, pp. 1–10, 2011.
- [119] C. Fillafer and M. Schneider, “On the excitation of action potentials by protons and its potential implications for cholinergic transmission,” *Protoplasma*, pp. 1–9, 2015.
- [120] B.-C. Burckhardt, B. Kroll, and E. Frömter, “Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes,” *Pflügers Archiv*, vol. 420, no. 1, pp. 78–82, 1992.
- [121] R. C. A. Frederickson, L. M. Jordan, and J. W. Phillis, “The action of noradrenaline on cortical neurons: effects of pH,” *Brain Research*, vol. 35, pp. 556–560, dec 1971.
- [122] D. H. Walters, W. Kuhn, and H. J. Kuhn, “Action Potential with an Artificial pH-Muscle,” *Nature*, vol. 189, pp. 381–383, feb 1961.
- [123] O. A. Krishtal and V. I. Pidoplichko, “A receptor for protons in the nerve cell membrane,” *Neuroscience*, vol. 5, pp. 2325–2327, 1980.
- [124] L. D. Landau and E. M. Lifšic, *Hydrodynamik. Lehrbuch der theoretischen Physik* / L. D. Landau, E. M. Lifschitz, Berlin: Akademie-Verlag, 5., überar ed., 1991.
- [125] J. Griesbauer, S. Bössinger, A. Wixforth, and M. F. Schneider, “Simultaneously propagating voltage and pressure pulses in lipid monolayers of pork brain and synthetic lipids,” *Phys. Rev. E*, vol. 86, p. 61909, 2012.
- [126] H. Träuble, “Membrane Electrostatics,” in *Structure of Biological Membranes* (S. Abrahamsson and I. Pascher, eds.), vol. 34 of *Nobel Foundation Symposia*, pp. 509–550, Springer US, 1977.
- [127] C. E. Mortimer and U. Müller, *Chemie : Das Basiswissen der Chemie*. Stuttgart: Thieme, 9., überar ed., 2007.
- [128] G. Cevc, A. Watts, and D. Marsh, “Titration of the phase transition of phosphatidylserine bilayer membranes. Effects of pH, surface electrostatics, ion binding, and head-group hydration,” *Biochemistry*, vol. 20, pp. 4955–4965, aug 1981.

- [129] M. R. Moncelli, L. Becucci, and R. Guidelli, “The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes.,” jun 1994.
- [130] R. Almog and D. S. Berns, “The role of polar groups in the interaction of dipalmitoyl phosphatidylcholine with chlorophyll a in monolayers,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 81, pp. 332–340, jun 1981.
- [131] H. Lamb, *Hydrodynamics*. Cambridge: University Press, third ed ed., 1906.
- [132] C. Ho and J. M. Sturtevant, “The Kinetics of the Hydration of Carbon Dioxide at 25 degree,” *J. Biol. Chem.*, vol. 238, no. 10, pp. 3499–3501, 1963.
- [133] K. S. Johnson, “Carbon dioxide hydration and dehydration kinetics in seawater,” *Limnology and Oceanography*, vol. 27, no. 5, pp. 849–855, 1982.
- [134] S. McLaughlin, N. Mulrine, T. Gresalfi, G. Vaio, and a. McLaughlin, “Adsorption of divalent cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine.,” *The Journal of general physiology*, vol. 77, no. April, pp. 445–473, 1981.
- [135] M. Papánková and D. Chorvát, “ESR study of the interaction of manganous ions with zwitterionic phospholipids and their mixtures with cholesterol,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 778, pp. 17–24, nov 1984.
- [136] C. Eckl, A. P. Mayer, and A. S. Kovalev, “Do Surface Acoustic Solitons Exist?,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 81, pp. 983–986, aug 1998.
- [137] A. S. Davydov, “Solitons in Molecular Systems,” *Physica Scripta*, vol. 20, no. 3-4, p. 387, 1979.
- [138] T. Heimburg and A. D. Jackson, “On soliton propagation in biomembranes and nerves,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 9790–9795, jul 2005.
- [139] S. Shrivastava and M. F. Schneider, “Evidence for two-dimensional solitary sound waves in a lipid controlled interface and its implications for biological signalling,” *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 11, no. 97, 2014.
- [140] S. Shrivastava, K. H. Kang, and M. F. Schneider, “Solitary shock waves and adiabatic phase transition in lipid interfaces and nerves,” *Phys. Rev. E*, vol. 91, p. 12715, jan 2015.
- [141] K. Kaufmann, *Action Potentials and Electrochemical Coupling in the Macroscopic Chiral Phospholipid Membrane*. 1989.

- [142] A. P. Demchenko, Y. Mély, G. Duportail, and A. S. Klymchenko, “Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes,” *Biophysical Journal*, vol. 96, no. 9, pp. 3461–3470, 2009.
- [143] X.-X. Zhang, Z. Wang, X. Yue, Y. Ma, D. O. Kieseewetter, and X. Chen, “pH-Sensitive Fluorescent Dyes: Are They Really pH-Sensitive in Cells?,” *Molecular pharmaceuticals*, vol. 10, pp. 1910–1917, may 2013.
- [144] S. Shrivastava and M. F. Schneider, “Opto-Mechanical Coupling in Interfaces under Static and Propagative Conditions and Its Biological Implications,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7, p. e67524, 2013.
- [145] R. C. MacDonald, S. A. Simon, and E. Baer, “Ionic influences on the phase transition of dipalmitoylphosphatidylserine,” *Biochemistry*, vol. 15, pp. 885–891, feb 1976.
- [146] U. Peterson, D. a. Mannock, R. N. a. H. Lewis, P. Pohl, R. N. McElhaney, and E. E. Pohl, “Origin of membrane dipole potential: Contribution of the phospholipid fatty acid chains,” *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 117, no. 1-2, pp. 19–27, 2002.
- [147] D. V. Matyushov and B. M. Ladanyi, “Nonlinear effects in dipole solvation .2. Optical spectra and electron transfer activation,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 107, no. 5, pp. 1375–1387, 1997.
- [148] D. J. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*. Weinheim: Wiley-VCH, 2010.
- [149] R. J. Lefkowitz, “Nobel Lecture: A Brief History of G Protein Coupled Receptors,” 2014.
- [150] L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz, “The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals.,” *Journal of cell science*, vol. 115, pp. 455–65, feb 2002.
- [151] S. G. F. Rasmussen, B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. A. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara, and B. K. Kobilka, “Crystal structure of the $\beta 2$ adrenergic receptor-Gs protein complex.,” *Nature*, vol. 477, pp. 549–55, sep 2011.
- [152] R. G. Shorr, S. L. Heald, P. W. Jeffs, T. N. Lavin, M. W. Strohsacker, R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron, “The beta-adrenergic receptor: rapid purification and covalent labeling by photoaffinity crosslinking.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 79, pp. 2778–82, may 1982.

- [153] T. Bugg, *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. Oxford: Blackwell Publ., 2. ed., [n ed., 2008.
- [154] M. A. Perillo, A. Guidotti, E. Costa, R. K. Yu, and B. Maggio, "Modulation of phospholipases A2 and C activities against dilauroylphosphorylcholine in mixed monolayers with semisynthetic derivatives of ganglioside and sphingosine," *Mol Membr Biol*, vol. 11, no. 2, pp. 119–126, 1994.
- [155] M. L. Fanani and B. Maggio, "Mutual modulation of sphingomyelinase and phospholipase A2 activities against mixed lipid monolayers by their lipid intermediates and glycosphingolipids.," *Molecular membrane biology*, vol. 14, no. 1, pp. 25–29, 1997.
- [156] T. Thuren, a. P. Tulkki, J. a. Virtanen, and P. K. Kinnunen, "Triggering of the activity of phospholipase A2 by an electric field.," *Biochemistry*, vol. 26, no. 16, pp. 4907–4910, 1987.
- [157] B. Maggio, "Modulation of phospholipase A2 by electrostatic fields and dipole potential of glycosphingolipids in monolayers.," *Journal of lipid research*, vol. 40, no. 5, pp. 930–939, 1999.
- [158] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnel, *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman, 6th ed. ed., 2008.
- [159] K. Kaufmann, *Acetylcholinesterase und die physikalischen Grundlagen der Nervenregung*. Universität Göttingen, 1980.
- [160] T. L. Rosenberry, "Quantitative simulation of endplate currents at neuromuscular junctions based on the reaction of acetylcholine with acetylcholine receptor and acetylcholinesterase," *Biophysical journal*, vol. 26, no. 2, pp. 263–289, 1979.
- [161] K. Kaufmann, "On the kinetics of acetylcholine at the synapse," *Naturwissenschaften*, vol. 64, pp. 371–376, jul 1977.
- [162] K. Kaufmann, "Fast kinetics of acetylcholine at synaptic membranes.," *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 12, no. Suppl. 2, pp. 169–178, 1977.
- [163] A. H. Futerman, R. M. Fiorini, E. Roth, M. G. Low, and I. Silman, "Physicochemical behaviour and structural characteristics of membrane-bound acetylcholinesterase from Torpedo electric organ. Effect of phosphatidylinositol-specific phospholipase C," *The Biochemical journal*, vol. 226, no. 2, pp. 369–377, 1985.
- [164] B. Kramer, *Electroreception and communication in fishes*, vol. 42. 1996.
- [165] G. Pancaldi, *Volta: Science and Culture in the Age of Enlightenment*. Princeton University Press, 2005.

- [166] I. Silman and A. H. Futerman, "Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane," *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 170, pp. 11–22, dec 1987.
- [167] D. R. Ripoll, C. H. Faerman, P. H. Axelsen, I. Silman, and J. L. Sussman, "An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, pp. 5128–32, jun 1993.
- [168] I. Shin, D. Kreimer, I. Silman, and L. Weiner, "Membrane-promoted unfolding of acetylcholinesterase: a possible mechanism for insertion into the lipid bilayer.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, pp. 2848–52, apr 1997.
- [169] H. I. Silman and A. Karlin, "Effect of local pH changes caused by substrate hydrolysis on the activity of membrane-bound acetylcholinesterase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 58, no. 4, pp. 1664–1668, 1967.
- [170] Y. Dudai, M. Herzberg, and I. Silman, "Molecular structures of acetylcholinesterase from electric organ tissue of the electric eel," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 70, no. 9, pp. 2473–2476, 1973.
- [171] G. L. Ellman, K. D. Courtney, J. V. R. Andres, and R. M. Feather-Stone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochemical pharmacology*, vol. 7, pp. 88–95, 1961.
- [172] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, and B. Zerner, "Reassessment of Ellman's reagent," *Methods in enzymology*, vol. 91, pp. 49–60, 1983.
- [173] T. A. Walmeley, M. H. Abernethy, and H. P. Fitzgerald, "Effect of Daylight on the Reaction of Thiols with Ellman's Reagent, 5, 5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoic acid)," *Methods in Enzymology*, no. 10, pp. 1981–1984, 1987.
- [174] J. V. Bonventre, "Phospholipase A2 and signal transduction.," *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 3, pp. 128–50, aug 1992.
- [175] Y. Boulanger, M. Labelle, and A. Khayat, "Role of phospholipase A2 on the variations of the choline signal intensity observed by 1H magnetic resonance spectroscopy in brain diseases," *Brain Research Reviews*, vol. 33, pp. 380–389, sep 2000.
- [176] Y. H. Pan, T. M. Epstein, M. K. Jain, and B. J. Bahnson, "Five Coplanar Anion Binding Sites on One Face of Phospholipase A2 : Relationship to Interface Binding," *Biochemistry*, vol. 40, pp. 609–617, jan 2001.

- [177] D. H. Adler, J. D. Cogan, J. A. Phillips, N. Schnetz-Boutaud, G. L. Milne, T. Iverson, J. A. Stein, D. A. Brenner, J. D. Morrow, O. Boutaud, and J. A. Oates, “Inherited human cPLA(2 α) deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction.,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 118, pp. 2121–31, jun 2008.
- [178] M. J. Su and C. C. Chang, “Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A2 activity (beta-bungarotoxin, taipoxin, crotoxin).,” *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, vol. 22, pp. 631–40, jan 1984.
- [179] A. Karkabounas, D. G. Georgiadou, P. Argitis, V. Psycharis, G. Nakos, A. M. Kosmas, and M. E. Lekka, “Immobilization of Lipid Substrates: Application on Phospholipase A2 Determination.,” *Lipids*, vol. 50, pp. 1259–71, dec 2015.
- [180] M. Katsumata, C. Gupta, and A. S. Goldman, “A rapid assay for activity of phospholipase A2 using radioactive substrate.,” *Analytical biochemistry*, vol. 154, pp. 676–81, may 1986.
- [181] M. Gudmand, S. Rocha, N. S. Hatzakis, K. Peneva, K. Müllen, D. Stamou, H. Uji-I, J. Hofkens, T. Bjørnholm, and T. Heimburg, “Influence of lipid heterogeneity and phase behavior on phospholipase A2 action at the single molecule level.,” *Biophysical journal*, vol. 98, pp. 1873–82, may 2010.
- [182] J. Li, Z. Chen, X. Wang, G. Brezesinski, and H. Möhwald, “Dynamic Observations of the Hydrolysis of a DPPC Monolayer at the Air/Water Interface Catalyzed by Phospholipase A2,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 39, pp. 3059–3062, sep 2000.
- [183] D. M. Quinn, “Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states,” *Chemical Reviews*, vol. 87, pp. 955–979, oct 1987.
- [184] G. de Haas, N. Postema, W. Nieuwenhuizen, and L. van Deenen, “Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, vol. 159, pp. 103–117, apr 1968.
- [185] Y. Inoue, “Effects of acoustic waves-induced dynamic lattice distortion on catalytic and adsorptive properties of metal, alloy and metal oxide surfaces,” *Surface Science Reports*, vol. 62, pp. 305–336, 2007.
- [186] M. F. Schneider, *Thermodynamische Zustände und Übergänge als Grundlage biologischer Funktionen - Von selbstorganisiertem Blut und Einsteins Sicht auf weiche Grenzflächen*. Habilitationsschrift, Universität Augsburg, 2010.

Literaturverzeichnis

- [187] C. Wittman, *Untersuchung thermodynamischer Fluktuationen von Acetylcholinesterase während der Katalyse in Abhängigkeit des pH-Wertes*. Bachelorarbeit, Universität Augsburg, 2012.

Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
AFM	Rasterkraftmikroskop
DMPS	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)-Dianion
HRP	Meerrettichperoxidase
OG	Oregon Green 488 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PLA₂	Phospholipase A ₂
TNB	Thionitrobenzoat

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und begleitet haben. Die vielen neu gewonnenen Freundschaften, die interessanten und kontroversen Diskussionen und die einzigartige Freiheit während meiner Doktorarbeit haben diese Zeit unvergesslich für mich gemacht. Besonderer Dank gilt dabei folgenden Personen:

Prof. Dr. Matthias Schneider und **Prof. Dr. Achim Wixforth**, die mir die Möglichkeit gaben in Augsburg und Boston an diesen spannenden biophysikalischen Fragestellungen zu forschen. Vielen Dank für die tolle Betreuung während der letzten Jahre, den Freiraum meinen eigenen Ideen nachzugehen und ein stets offenes Ohr für meine Anliegen. Ich habe diese Zeit sehr genossen und fachlich und auch persönlich viel von Euch lernen dürfen.

Prof. Dr. Henning Höppe für die sofortige und freundliche Bereitschaft, die Zweitbegutachtung dieser Arbeit zu übernehmen.

Dr. Konrad Kaufmann für die unermüdlichen und inspirierenden Ausführungen über den zweiten Hauptsatz der Thermodynamik und dessen Rolle für das Leben, sowie für Deine begeisternde Art.

Prof. Dr. Isreal Silman für die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

F. Cevik, A. Hupfer, S. Lieber, A. Mainka, A. Hörner, O. Ustinov und **S. Spörhase**, die mir bei allen technischen und bürokratischen Fragen zur Seite standen und mir dadurch meine Arbeit sehr erleichtert haben.

Meinen Studenten **Christoph Wittman, Simon Kirschler, Maria Cruz Cardenosa Rubio** und **Tobias Hartlieb**, die einige Messungen für diese Arbeit beigetragen haben und mich mit ihren neugierigen und interessierten Fragen immer wieder zum Nachdenken angeregt haben.

Dr. Christian Fillafer, Dr. Shamit Shrivastava und **Heeyong Kang** für die Hilfe bei den Fluoreszenzmessungen, die Einführung in die „Algenfolterkammer“ und vor allem für die großartige Zeit in Boston.

Meinen Mitstreitern **Florian Strobl, Dominik Breyer, Andreas Hartmann** und **Dr. Christoph Westerhausen** für die interessanten Gespräche und Diskussionen innerhalb und außerhalb der Uni, die netten Abende und die super Arbeitsatmosphäre.

Meinen Mitdoktoranden und Zimmerkollegen **Michael Kreißle**, **Ben Paschke**, **Stephan Kapfinger**, **Tobias Stegmüller**, **Daniel Ott**, **Roland Marstatt**, **Johannes Lunderschmid**, **Judith Seibert**, **Melanie Stamp**, **Richard Rambach** und **Thomas Geislinger** für die stets gute Laune und Unterstützungen jedweder Art.

Allen meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren auf diesem Weg begleitet haben und eine unerlässliche Motivations- und Inspirationsquelle für mich darstellen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern **Ingeborg** und **Rudolf**, sowie meinen Geschwistern **Regina**, **Katharina** und **Franziska** bedanken. Ohne den konstanten Rückhalt von Zuhause, die Hilfestellungen im Hintergrund und das stete Vertrauen in mich, wäre nicht nur diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen, sondern mein Leben bei weitem nicht so lebenswert.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Frau **Paula** bedanken, die mir mit unendlich viel Liebe und Zuneigung zur Seite steht, stets an mich glaubt und mein Leben um so viel reicher macht.

Für die finanzielle und ideelle Unterstützung folgender Institutionen während meiner Doktorarbeit bedanke ich mich sehr:

1. **Studienstiftung des deutschen Volkes**
2. Internationales Doktorandenkolleg **NanoBioTechnology**
3. **Nanosystems Initiative Munich**